



Cultivo e utilização de macroalgas em alimentos funcionais para aquacultura

Patrícia da Silva Lopes Cardoso

Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos

Departamento de Biologia

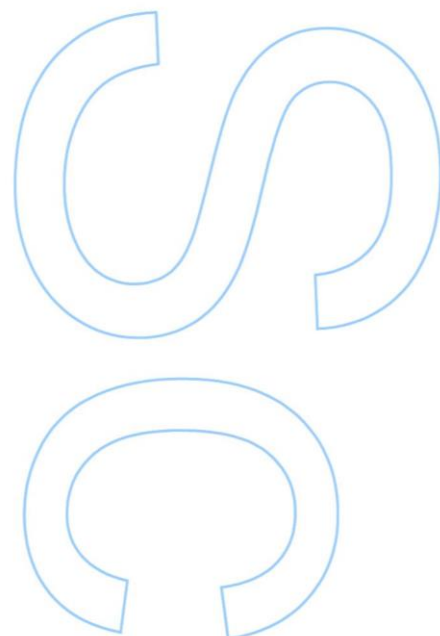
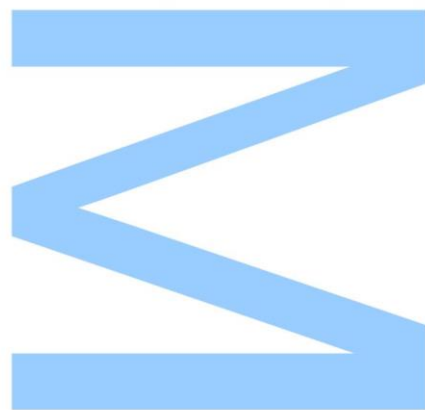
2018/2019

Orientador

Dra. Ana Isabel Santos Couto, Professor Auxiliar Convidado, Faculdade de Ciências
Universidade do Porto

Coorientador

Dr. Rui Pedro Gonçalves Pereira, Diretor de Laboratório, ALGApplus

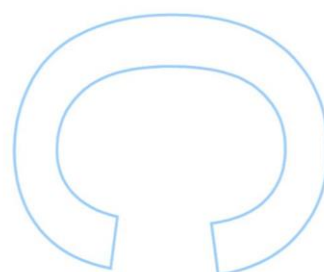
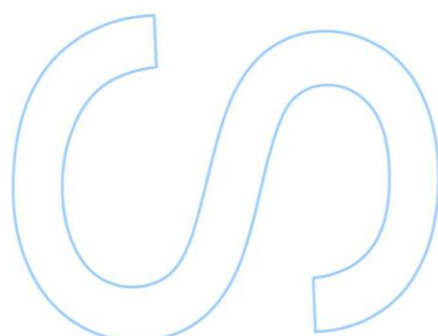
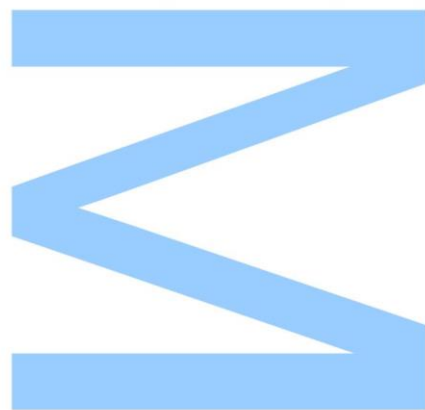




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

À Dra. Ana Couto, um muito obrigado por ter promovido o meu encontro com a empresa ALGAplus e consequentemente a possibilidade concretizada de estágio. Pela sua orientação ao longo do estágio, amabilidade, disponibilidade e paciência ao longo do processo de escrita.

Ao Dr. Rui Pereira, um sincero agradecimento por me ter aberto as portas da empresa e aceite o meu estágio. Agradeço, ainda, pela sua disponibilidade e orientação ao longo do estágio e pelos conhecimentos que me transmitiu, bem como pela sua ajuda na escrita do presente relatório.

A toda a equipa da ALGAplus pelos ensinamentos e integração na empresa. À Andreína Azevedo e à Sara Morgado, um agradecimento especial por toda a amizade, apoio e disponibilidade ao longo deste estágio. Agradeço ainda pelos conhecimentos, orientação que me transmitiram ao longo do período que estive na empresa.

À Marta Monteiro, por me ter acolhido no seu projeto de doutoramento transmitido os seus conhecimentos, bem como pela sua ajuda na análise estatística dos resultados do presente relatório.

Aos meus amigos e familiares mais próximos, um obrigado sincero por todo o companheirismo e apoio que me transmitiram nesta etapa fulcral da minha vida. Agradeço ainda por todos os desabafos, motivação e conselhos que tornaram este percurso mais fácil.

Um agradecimento muito especial aos meus pais e ao meu irmão, por me acompanharem não só nesta etapa, mas durante toda a minha vida. Por todo o amor, apoio e motivação, sem eles, nada teria sido possível.

A todos um enorme e sincero obrigada.

Sumário

Nos últimos anos, o consumo de alimento proveniente do mar tem vindo a aumentar substancialmente, como consequência de uma maior consciencialização do seu elevado valor nutricional. A aquacultura surge com o objetivo de garantir alimento à população mundial, de uma forma mais sustentável, e sem colocar em causa o *stock* das espécies aquáticas.

Portugal, com a sua localização geográfica e a sua Zona Económica Exclusiva de grandes dimensões, possui elevado potencial para a atividade aquícola. Contudo, atualmente, o nosso país possui uma atividade bastante reduzida neste setor em comparação com os grandes produtores mundiais, como a China, a Índia, a Indonésia o Vietname, o Bangladesh o Egipto e a Noruega. Por esta razão, é necessário fomentar a produção aquícola em Portugal, bem como diversificar as espécies cultivadas. É ainda necessário desenvolver tecnologias que facilitem o processo de produção e realizar estudos centralizados na espécie que se pretende produzir, com o objetivo de alcançar conhecimentos que permitam um maior sucesso no processo de produção.

A empresa ALGAplus, é uma empresa focada no setor da aquacultura, com o objetivo de cultivar algas marinhas de alta qualidade, de uma forma sustentável, face à crescente demanda destas matérias-primas. É a primeira e única empresa, em Portugal, a cultivar espécies de algas marinhas nativas do Atlântico, integrado com douradas e robalos, sob o conceito de Aquacultura Multi-trófica Integrada (IMTA). Todas as suas atividades relacionadas com a produção e processamento das algas marinhas, possuem certificação orgânica, segundo as normas da União Europeia. As espécies comercializadas são: *Chondrus crispus*, *Codium tomentosum*, *Fucus vesiculosus*, *Gracilaria* sp., *Palmaria palmata*, *Porphyra dioica*, *Porphyra umbilicalis* e *Ulva rigida*. O estágio na empresa decorreu de 19 de setembro de 2018 a 17 de junho de 2019

As algas apresentam ser uma fonte de compostos bioativos, tais como, polissacarídeos, vitaminas, ácidos gordos e carotenoides, que possuem propriedades, antibacterianas, antivirais, antifúngicas, antioxidativas, anti-inflamatórias e antitumorais. Como tal, devido ao seu elevado potencial, tem vindo a ser testada a aplicação de extratos, de diferentes espécies de algas, em rações para espécies de peixes produzidas em aquacultura.

Após o estágio, durante o mês de julho, tive a oportunidade de participar num projeto de doutoramento. No estudo, o peixe-zebra (*Danio rerio*) foi utilizado como modelo experimental, com o objetivo de verificar se a bioatividade de extratos de duas

espécies de macroalgas (*Fucus vesiculosus* e *Ulva rigida*) e de uma espécie de microalga (*Nannochloropsis gaditana*), produz algum efeito no crescimento e na saúde do peixe-zebra (*Danio rerio*), de forma a avaliar a sua adequação como ingredientes em alimento para peixes, nomeadamente, para corvina (*Argyrosomus regius*).

No estudo, foram formuladas 7 dietas experimentais com inclusão de 1% de extrato *Fucus vesiculosus* (D2), 1% extrato de *Nannochloropsis gaditana* (D3), 1% de extrato de *Ulva rigida* (D4), 1% de extrato de *Fucus vesiculosus* e 1% de extrato *Nannochloropsis gaditana* (D5), 1% de extrato *Fucus vesiculosus* e 1% de extrato *Ulva rigida* (D6), 1% de extrato *Nannochloropsis gaditana* e 1% de extrato *Ulva rigida* (D7), 1% de extrato *Fucus vesiculosus*, 1% de extrato *Nannochloropsis gaditana* e 1% de extrato *Ulva rigida* (D8); e, ainda, um controlo negativo (D1) e um controlo positivo (D9). As dietas foram atribuídas, em duplicado, a grupos de peixe-zebra (n=30; 0,08g \pm 0,1 média de peso inicial) alimentados até saciedade aparente, durante 1 mês (30 dias).

O ganho em biomassa (g) e a taxa de crescimento diário aumentaram nos peixes alimentados com a D9, a única dieta que possui farinha de peixe na sua composição, apresentando uma diferença significativa em relação às restantes dietas experimentais ($P < 0,05$). Os restantes parâmetros calculados, sobrevivência (%), consumo diário de ração (g/dia) e taxa de conversão alimentar, não apresentaram diferenças significativas entre grupos ($P > 0,05$).

A D9 promoveu um maior crescimento nos peixes-zebra testados, demonstrando diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. Contudo, dentro das restantes dietas experimentais, verificou-se que as dietas que promoveram um maior crescimento foram D3 e D5, apesar de não se verificar uma diferença significativa entre grupos.

Palavras-chave

ALGApplus; *Danio rerio*; *Fucus vesiculosus*; *Gracilaria* sp.; *Nannochloropsis gaditana*; nutrição; macroalga; *Porphyra dioica*; *Porphyra umbilicalis*; *Ulva rigida*.

Abstract

In the last few years, marine derived products consumption has been substantially increasing as a consequence of a greater awareness of their high nutritional value. Aquaculture appears with the objective of ensure food to world population in a more sustainable way and without threatening aquatic species stocks.

Portugal, with its geographical location and large Exclusive Economic Zone, owns high potential for aquaculture activity. However, nowadays, our country has reduced activity in this sector when compared with other major world producers, namely China, India, Indonesia, Vietnam, Bangladesh, Egypt and Norway. For this reason, it is necessary to promote aquaculture production in Portugal, as well as diversify the cultivated species. Furthermore, there is a need to develop technology that facilitates the production process and to perform studies centred in the intended species, with the objective of achieving knowledge that allow a greater success in the production process.

ALGApplus, is a company focused in the aquaculture sector, with the objective of cultivating high quality seaweeds, in a sustainable way, that answers the increasing demand for these raw materials. It is the first and only company, in Portugal, to cultivate seaweeds species native from the Atlantic, together with gilthead seabream and European sea bass, under the concept of Integrated Multi-trophic Aquaculture (IMTA). Its entire activity is related with the production and process of seaweeds, having an organic certification according to European Union guidelines. The commercialized species are: *Chondrus crispus*, *Codium tomentosum*, *Fucus vesiculosus*, *Gracilaria* sp., *Palmaria palmata*, *Porphyra dioica*, *Porphyra umbilicalis* and *Ulva rigida*. My internship in the company ran from September 19th, 2018 to June 17th, 2019.

The seaweeds are a source of bioactive compounds such as polysaccharides, vitamins, fatty acids and carotenoids that have antibacterial, antiviral, antifungal, antioxidant, anti-inflammatory and anti-tumor properties. Due to these properties' high potential, the application of different seaweed species extracts in diets for aquaculture produced fish species has been tested.

After the internship, during the month of July, I had the opportunity to participate in a PhD project. In the project, zebra-fish (*Danio rerio*) was used as experimental model, with the objective of verifying if the extracts of two macroalgae species (*Fucus vesiculosus* and *Ulva rigida*) and from one microalgae specie (*Nannochloropsis gadinata*), produces any effect in zebra-fish's growth and health, in order to evaluate its suitability as ingredients for fish food, namely for meagre (*Argyrosomus regius*).

In the study, seven experimental diets were formulated with the inclusion of 1% of *Fucus vesiculosus* (D2) extract, 1% of *Nannochloropsis gaditana* (D3) extract, 1% of *Ulva rigida* (D4) extract, 1% of *Fucus vesiculosus* extract and 1% *Nannochloropsis gaditana* (D5) extract, 1% of *Fucus vesiculosus* extract and 1% of *Ulva rigida* (D6) extract, 1% of *Nannochloropsis gaditana* and 1% of *Ulva rigida* (D7) extract, 1% of *Fucus vesiculosus* extract, 1% from *Nannochloropsis gaditana* extract and 1% of *Ulva rigida* (D8) extract; and, in addition, a negative control (D1) and a positive control (D9). The diets were attributed, in duplicate, to zebra-fish groups (n=30; initial weight = 0.08g ± 0,1) fed until apparent satiety during thirty days.

Weight gain (g) and daily growth rate increased in fish fed with D9, the only diet containing fish meal in its composition, presenting a significant difference comparing with all other experimental diets ($P < 0.05$). The remaining calculated parameters: survival (%), daily ration consumption (g/day) and food conversion rate, did not present significant differences amongst groups ($P > 0.05$).

The D9 promoted a greater growth in zebra-fish under test, evidencing significant differences between the different treatments. However, amongst the remaining experimental diets, it was verified that the ones that promoted a greater growth were D3 and D5 although not statistically significant.

Keywords

ALGApplus; *Danio rerio*; *Fucus vesiculosus*; *Gracilaria* sp.; *Nannochloropsis gaditana*; nutrition; *Porphyra dioica*; *Porphyra umbilicalis*; seaweed; *Ulva rigida*.

Índice

Agradecimentos.....	i
Sumário	ii
Palavras-chave	iii
<i>Abstract</i>	iv
<i>Keywords</i>	v
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	x
Lista de abreviaturas.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1 As algas: Revisão geral dos organismos	1
1.2 O valor das macroalgas marinhas	2
1.3 Produção de macroalgas a nível mundial	4
1.3.1 Valores	4
1.4 Produção de macroalgas em Portugal.....	7
1.4.1 Valores	7
1.4.2 Potencial crescimento	8
1.5 Sistemas de Produção	9
1.5.1 Cultivo em Portugal.....	12
1.6 Estado Mundial das Pescas e Aquacultura.....	12
1.7 Sistemas de Aquacultura Multi-trófica Integrada.....	14
1.8 Macroalgas em rações de peixes	16
1.9 Extratos de algas nas rações de peixes	19
1.10 Peixe-zebra (<i>Danio rerio</i> ; Hamilton, 1822)	21
1.10.1 Peixe-zebra como modelo experimental	22
1.11 <i>Fucus vesiculosus</i> (Linnaeus, 1753).....	23
1.11.1 Potenciais aplicações e interesse económico	25

1.12	<i>Gracilaria</i> sp.	25
1.12.1	Potenciais aplicações e interesse económico	27
1.13	<i>Porphyra dioica</i> (J. Brodie & L.M. Irvine, 1997) e <i>Porphyra umbilicalis</i> (Kützinger, 1843).....	28
1.13.1	Potenciais aplicações e interesse económico	31
1.14	<i>Ulva rigida</i> (C. Agardh, 1823)	32
1.14.1	Potenciais aplicações e interesse económico	34
1.15	Empresa ALGAplus.....	35
1.15.1	Departamento de Produção	35
1.15.2	Departamento de Investigação, Desenvolvimento e Inovação (IDI)	37
1.16	Objetivos	37
2.	Metodologia	39
2.1	Preparação, lavagem e armazenamento do material	41
2.2	Lavagem e preparação dos <i>carboys</i> com água salgada autoclavada e filtrada ..	42
2.3	Lavagem e preparação dos garrafões de 10L e dos garrafões de 20L	43
2.4	Pulsos – adição de meio às culturas	44
2.5	Mudanças de meio	45
2.6	Raspagens de <i>Porphyra dioica</i> e <i>Porphyra umbilicalis</i>	46
2.7	Transferências de garrafões de 10L para garrafões de 20L	47
2.8	Transferências de garrafões de 20L de <i>Porphyra dioica</i> e de <i>Porphyra umbilicalis</i> para o exterior	47
2.9	Manutenção das culturas no exterior.....	49
2.9.1	<i>Porphyra dioica</i> e <i>Porphyra umbilicalis</i>	51
2.9.2	<i>Codium tomentosum</i>	53
2.9.3	<i>Gracilaria</i> sp.....	54
2.10	Rotinas diárias Produção 1 e Produção 2.....	54
2.10.1	Verificação dos tanques.....	54
2.10.2	Filtros de saída de água dos tanques da Produção 1:	55
2.10.3	Tubos de saída de água dos tanques da Produção 2:	55

2.10.4 Filtros de entrada de água nos tanques:	55
2.10.5 Filtros mecânicos de água salgada	56
3. Ensaio Experimental	58
3.1 Métodos	58
3.1.1 Extratos de algas	58
3.1.2 Dietas experimentais	59
3.1.3 Ensaio experimental	60
3.1.4 Amostragem	61
3.1.5 Análise estatística	62
3.2 Resultados	62
3.3 Discussão.....	64
4. Referências Bibliográficas	67

Índice de Figuras

Figura 1 - Cultivo em linha: Método de cultura de <i>Eucheuma</i> praticado nas Filipinas (Alih, 1989).	10
Figura 2 - Cultivo em rede: Método de cultura de <i>Eucheuma</i> praticado nas Filipinas (Alih, 1989).	11
Figura 3 - Jangadas flutuantes: Método de cultura de <i>Eucheuma</i> praticado nas Filipinas (Alih, 1989).	11
Figura 4 - Exemplo de um esquema de um sistema IMTA no qual as setas indicam o percurso dos recursos (ex, nutrientes e energia) entre os possíveis componentes.	14
Figura 5 – <i>Danio Rerio</i> (fonte: https://www.fishbase.de/).....	21
Figura 6 - <i>Fucus vesiculosus</i> (Linnaeus, 1753) (fonte: http://www.algaebase.org/).	23
Figura 7 - Ciclo de vida do género <i>Fucus</i> mostrando diferentes estágios de desenvolvimento (fonte: http://www.biologydiscussion.com/algae/classification-of-fucals-with-diagram-algae/58105).	24
Figura 8 - <i>Gracilaria vermiculophylla</i> (fonte: http://www.algaebase.org/).	26
Figura 9 - O ciclo de vida da <i>Gracilaria</i> (Kain e Destombe, 1995).	26
Figura 10 - <i>Porphyra umbilicalis</i> (Kützinger, 1843) (fonte: http://www.algaebase.org/)..	29
Figura 11 - <i>Porphyra dioica</i> (J.Brodie & L.M.Irvine, 1997) (fonte: http://www.algaebase.org/).	29
Figura 12 - Ciclo de vida do género <i>Porphyra</i> mostrando diferentes estágios de desenvolvimento (Baweja <i>et al.</i> , 2016).	30
Figura 13 - <i>Ulva rigida</i> (C. Agardh, 1823) (fonte: http://www.algaebase.org/).....	32
Figura 14 - Ciclo de vida do género <i>Ulva</i> mostrando diferentes estágios de desenvolvimento (fonte: http://www.biologydiscussion.com/algae/classification-of-ulvales-algae/57951).....	33
Figura 15 - Esquema do movimento da alga com arejamento central, na parte inferior dos tanques.	39
Figura 16 - Esquema da planta das instalações da empresa ALGApplus.	50
Figura 17 - Filtros mecânicos de água salgada desde 0,2 µm, 10 µm e 20µm, situados no exterior do laboratório.	56

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Principais produtores de algas marinhas cultivadas (milhares de toneladas, em peso fresco) (fonte: FAO, 2018b).....	5
Tabela 2 – Produção aquícola mundial de plantas aquáticas (milhares de toneladas, em peso fresco) (fonte: FAO, 2018b).....	6
Tabela 3 – Produção de aquicultura em águas interiores e oceânicas por tipo de água e regime, segundo as espécies (fonte: INE, 2019).....	8
Tabela 4 – Classificação taxonómica de <i>Danio rerio</i> (fonte: https://www.fishbase.de/).	21
Tabela 5 – Classificação taxonómica de <i>Fucus vesiculosus</i> (fonte: http://www.algaebase.org/).	23
Tabela 6 – Classificação taxonómica de <i>Gracilaria</i> sp (fonte: http://www.algaebase.org/).	25
Tabela 7 – Classificação taxonómica de <i>Porphyra dioica</i> e <i>Porphyra umbilicalis</i> (fonte: http://www.algaebase.org/).	28
Tabela 8 – Classificação taxonómica de <i>Ulva rigida</i> (Fonte: http://www.algaebase.org/).	32
Tabela 9 – Ingredientes das dietas experimentais.	59
Tabela 10 – Dados de crescimento dos peixe-zebra, com peso inicial de 0,08 g, alimentados com as diferentes dietas experimentais (média ± desvio-padrão, peso inicial n=30; restantes parâmetros n=22 em D1 e n=21 nas restantes dietas). Diferentes letras, na mesma linha, indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).	63

Lista de abreviaturas

µm – Micrómetro

ASW – *Autoclaved seawater*

atm – atmosfera

D1 – Dieta controlo negativo

D2 – Dieta com 1% de extrato *Fucus vesiculosus*

D3 – Dieta com 1% extrato de *Nannochloropsis gaditana*

D4 – Dieta com 1% de extrato de *Ulva rigida*

D5 – Dieta com 1% de extrato de *Fucus vesiculosus* e 1% de extrato *Nannochloropsis gaditana*

D6 – Dieta com 1% de extrato *Fucus vesiculosus* e 1% de extrato *Ulva rigida*

D7 – Dieta com 1% de extrato *Nannochloropsis gaditana* e 1% de extrato *Ulva rigida*

D8 – Dieta com 1% de extrato *Fucus vesiculosus*, 1% de extrato *Nannochloropsis gaditana* e 1% de extrato *Ulva rigida*

D9 – Dieta controlo positivo

FAO – Food and Agriculture Organization

FSW – *Filtered seawater*

IDI – Departamento de Investigação, Desenvolvimento e Inovação

IMTA – *Integrated Multi-trophic Aquaculture*

LD – *Long-day*

NSP – *Non-starch polysaccharides*

SD – *Short-day*

1. Introdução

A Aquicultura consiste na criação ou na cultura de organismos aquáticos, através da aplicação de técnicas concebidas para aumentar a produção desses mesmos organismos, para além das capacidades naturais do meio (DGRM, 2019).

Ao longo dos séculos, as algas marinhas, têm vindo a ser utilizadas por todas as partes do mundo. Para além de serem bastante utilizadas em diversas indústrias, contribuem de forma significativa para o estado nutricional do ser humano, devido à sua composição em macronutrientes (proteínas, lípidos e hidratos de carbono) em minerais (sódio, cálcio, magnésio, potássio, cloro, enxofre, fósforo, iodo, ferro, zinco, cobre, selénio, molibdénio, fluoreto, magnésio, boro, níquel e cobalto) e em vitaminas (B12, A, K) (FAO, 2018a).

1.1 As algas: Revisão geral dos organismos

O nome *Algae*, surge pela primeira vez com Linnaeus (1753), para designar uma categoria taxonómica de plantas (Bicudo & Menezes, 2010). As algas, têm um contributo fundamental no que diz respeito à biodiversidade mundial, com um número estimado de espécies que varia entre 36 000 a mais de 10 milhões. Cada espécie dispõe de uma combinação única de características e, conseqüentemente, faz com que possuam um papel fundamental nos ecossistemas. As diferentes espécies de algas são divididas em diferentes “*phyla*” (divisões), conforme: os pigmentos fotossintéticos que utilizam para a fotossíntese, o armazenamento de substâncias de reserva e o tipo de revestimento das células (Graham *et al.*, 2008).

Estes organismos podem ser encontrados numa ampla variedade de *habitats*; desde aquáticos, como em água doce, água salgada, água marinha e águas subterrâneas superficiais; e terrestres, desde em animais e plantas (em simbiose), como no solo e em rochas. Na verdade, estão presentes em qualquer local no qual exista luz suficiente para que sejam capazes de realizar fotossíntese (El Gamal, 2010; Singh & Singh, 2015).

Apresentam uma morfologia simples, com baixo nível de diferenciação celular, quando comparadas a outros grupos de organismos fotossintéticos (Bicudo & Menezes, 2010), podendo ser identificados dois tipos principais, micro e macroalgas. Apresentam uma ampla variação de tamanho, uma vez que, as microalgas são observadas a partir dos 3-10 µm e as macroalgas são capazes de atingir 70 m de comprimento, podendo crescer até 50 cm por dia (El Gamal, 2010).

As microalgas são organismos unicelulares que se podem apresentar na forma isolada, na qual são compostas por uma única célula, ou então, podem agrupar-se, dando origem a colónias. Estão presentes tanto em *habitats* bênticos como em *habitats* costeiros, assim como na coluna de água dos oceanos, na forma de fitoplâncton (Garson, 1989; Graham *et al.*, 2008).

As macroalgas são organismos multicelulares, que podem ser observadas na forma cenocítica (estruturas multinucleadas) parenquimatosa e pseudoparenquimatosa. Ocupam essencialmente a zona litoral incluindo, nomeadamente, as algas castanhas, as algas verdes, e as algas vermelhas (Garson, 1989; Graham *et al.*, 2008).

As algas possuem clorofila e outros pigmentos fotossintéticos que retêm a energia solar. Durante o processo da fotossíntese, a energia solar é convertida em energia química. No final do processo, as algas armazenam a energia sob a forma de hidratos de carbono. Diversos parâmetros afetam o crescimento das algas, contudo, este depende de forma significativa, da radiação solar dos tanques ou do corpo de água em que se encontram (Singh & Singh, 2015).

A composição química das macroalgas varia de espécie para espécie, estado fisiológico, maturidade, *habitat* e condições ambientais (Ito & Hori, 1989; Wong & Cheung, 2000). Em geral, as macroalgas são ricas em proteínas, vitaminas, hidratos de carbono, fibras, lípidos e minerais (Rodríguez-González *et al.*, 2014). As algas marinhas são utilizadas tanto na alimentação humana como na de animais, devido ao seu teor em minerais e, pelas propriedades funcionais dos seus compostos bioativos. O teor proteico das algas marinhas difere de acordo com a espécie em causa e a época sazonal (Fleurence, 1999; Cruz-Suárez *et al.*, 2008).

1.2 O valor das macroalgas marinhas

Atualmente, o efeito negativo das alterações climáticas começa a ser notado na agricultura. O aumento da temperatura do ar, humidade, secas extremas e a variabilidade das chuvas, têm vindo a afetar a produtividade deste setor ao ponto de as projeções de valores da sua produção, começarem a ser duvidosas. Além disso, para que a agricultura alcance o seu potencial, requer um suprimento de água doce constante, caso contrário, dependendo da cultura, um a alguns dias sem o fornecimento de água adequado, pode destruir o rendimento de uma cultura inteira. Por exemplo, a cultura de soja e de milho, necessita de captar do solo cerca de 40 000L de água por hectare por dia. Sendo que, grande parte é perdida por evapotranspiração e apenas uma pequena fração permanece na cultura (Forster & Radulovich, 2015).

Por outro lado, com a tecnologia disponível, é possível cultivar extensas áreas marítimas, que podem ser utilizadas para a produção de algas marinhas, sem necessitarem de água doce ou fertilizantes (Radulovich *et al.*, 2015), que é um dos custos da produção na agricultura terrestre bastante significativo, uma vez que, as águas costeiras encontram-se enriquecidas com nutrientes (Forster & Radulovich, 2015).

Como tal, é possível deduzir que, uma das principais mais valias da produção de algas marinhas é o simples facto de não necessitarem de água doce para o seu cultivo. Isto porque, no futuro, com as alterações climáticas, a água doce será um recurso bastante valioso, devido à sua pouca disponibilidade. Como tal, as algas marinhas, apresentam-se como uma fonte de alimento mais sustentável, comparativamente com as culturas terrestres.

Países como a China, Japão e Coreia, têm utilizado as algas marinhas na sua alimentação, desde a antiguidade. Para além da sua importância na alimentação, as algas marinhas são também utilizadas como fonte de hidrocolóides, tais como, agar, carragenina e alginato (Dawczynski *et al.*, 2007). As algas marinhas são uma fonte muito abundante de compostos bioativos, como polissacarídeos e pigmentos, que são extremamente valiosos para as indústrias farmacêuticas e alimentar. Estudos realizados demonstram ainda que as algas marinhas podem ser utilizadas como fonte de nutrientes em rações para aquacultura (Valente *et al.*, 2006; Peixoto *et al.*, 2019).

Algas vermelhas, como, *Gelidium*, *Gracilaria* e *Pterocladia*, possuem um papel importante tanto no consumo humano, bem como, noutras aplicações, nomeadamente, como ligantes em produtos alimentares e em substratos bacterianos utilizados em laboratório. O agar, há mais de 300 anos que possui uma forte procura, na maioria dos países asiáticos, como produto alimentar. Este hidrocolóide é produzido, sobretudo, a partir das espécies do género *Gracilaria*. Segundo dados da FAO, em 2015, a China apresentou ser a líder mundial no cultivo deste género de algas marinhas, tendo efetuado a colheita de 2,7 milhões de toneladas. Atualmente, a China e o Chile, são os principais produtores e exportadores de agar (FAO, 2018a).

Na Ásia, as algas verdes, tais como, *Ulva* sp., *Enteromorpha* sp., *Monostroma* sp., *Caulerpa* sp. e *Codium* sp., são recursos alimentares bastante importantes, consumidos principalmente crus, secos ou cozidos. Sendo consideradas como boas fontes de fibra, proteína e minerais, para consumo humano (FAO, 2018a).

Os alginatos, extraídos de várias espécies de algas castanhas, têm vindo a ser utilizados na indústria de estampagem têxtil (*printing industry*) desde, aproximadamente, 1020 (FAO, 2018a).

1.3 Produção de macroalgas a nível mundial

1.3.1 Valores

Em 2016, a aquacultura produziu 96,5% do volume total dos 31,2 milhões de toneladas de plantas aquáticas colhidas do meio natural e das plantas aquáticas cultivadas. A produção mundial das plantas aquáticas cultivadas, na qual predominam sobretudo algas marinhas, aumentou de um volume de 13,5 milhões de toneladas (em 1995) para 30,1 milhões de toneladas (em 2016). Os principais produtores foram a China, com 47,9% do total produzido, e a Indonésia, com 38,7% do total produzido (Tabela 1). Das plantas aquáticas cultivadas, as macroalgas marinhas foram produzidas num volume bastante superior ao de microalgas (FAO, 2018b).

Atualmente, a indústria mundial de macroalgas marinhas, vale mais do que 5,5 biliões de euros onde, cerca de 85% são produtos alimentares para consumo humano. Os extratos derivados de macroalgas compreendem cerca de 40% do mercado mundial de hidrocolóides, e o resto provém de animais, micróbios e plantas terrestres (FAO, 2018a).

No Sudeste Asiático, Malásia e Tailândia, verificou-se que as importações excederam as exportações, de macroalgas marinhas processadas e semi-processadas. Aliás, na Indonésia, a procura a nível doméstico desses produtos, tem vindo a aumentar cada vez mais. Na América Latina, a importação de hidrocolóides tem aumentado na Argentina, Brasil, México e outros países (FAO, 2018a). As macroalgas marinhas possuem um papel fundamental em diversas culturas, nomeadamente na Ásia oriental, onde são frequentemente utilizadas em sopas e no *sushi*. Espécies de algas vermelhas, como *Pyropia* e *Porphyra*, vulgarmente conhecidas por *nori*, são utilizadas para envolver as peças de *sushi* (FAO, 2018b).

Em 2016, segundo os dados publicados no relatório da FAO, as espécies de macroalgas mais cultivadas foram *Eucheuma* spp. com 10,5 milhões de toneladas (34,90% do total produzido), *Laminaria japonica* com 8,2 milhões de toneladas (27,27% do total produzido) e *Gracilaria* spp. com 4,2 milhões de toneladas (13,77% do total produzido) (Tabela 2) (FAO, 2018b).

Tabela 1 – Principais produtores de algas marinhas cultivadas (milhares de toneladas, em peso fresco) (fonte: FAO, 2018b).

	2005	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	% do total, 2016
China	9 446	10 995	11 477	12 752	13 479	13 241	13 835	14 387	47,9
Indonésia	911	3 915	5 170	6 515	9 299	10 077	11 269	11 631	38,7
Filipinas	1 339	1 801	1 841	1 751	1 558	1 550	1 566	1 405	4,7
República da Coreia	621	902	992	1 022	1 131	1 087	1 197	1 351	4,5
República Popular Democrática da Coreia	444	444	444	444	444	489	489	489	1,6
Japão	508	433	350	441	418	374	400	391	1,3
Malásia	40	208	240	332	269	245	261	206	0,7
Tanzânia	77	132	137	157	117	140	179	119	0,4
Madagáscar	1	4	2	1	4	7	15	17	0,1
Chile	16	12	15	4	13	13	12	15	0
Ilhas Salomão	3	7	7	7	12	12	12	11	0
Vietname	15	18	14	19	14	14	12	10	0
Papua Nova Guiné	0	0	0	1	3	3	4	4	0
Quiribáti	5	5	4	8	2	4	4	4	0
Índia	1	4	5	5	5	3	3	3	0
Outros	25	14	15	16	13	12	16	8	0
Total	13 450	18 895	20 712	23 475	26 780	27 270	29 275	30 050	

Segundo a FAO, o rápido crescimento do cultivo de espécies de algas marinhas como *Kappaphycus alvarezii* e *Eucheuma* spp., observado no último ano, deve-se, sobretudo, à crescente procura destas algas para extração de carragenina, especialmente na Indonésia. Como tal, é possível observar um aumento substancial do seu cultivo na Indonésia, sendo que, em 2010 não passou mais do que 4 milhões de toneladas e em 2016 foram produzidas mais de 11 milhões de toneladas (FAO, 2018b).

Tabela 2 – Produção aquícola mundial de plantas aquáticas (milhares de toneladas, em peso fresco) (fonte: FAO, 2018b).

Espécies	2005	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
<i>Euclima</i> spp.	987	3 481	4 616	5 853	8 430	9 034	10 190	10 519
<i>Laminaria japonica</i>	4 371	5 147	5 257	5 682	5 942	7 699	8 027	8 219
<i>Gracilaria</i> spp.	933	1 691	2 171	2 763	3 460	3 751	3 881	4 150
<i>Undaria pinnatifida</i>	2 440	1 537	1 755	2 139	2 079	2 359	2 297	2 070
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	1 285	1 888	1 957	1 963	1 726	1 711	1 754	1 527
<i>Porphyra</i> spp.	703	1 072	1 027	1 123	1 139	1 142	1 159	1 353
Algas <i>nep</i> , <i>Algae</i>	1 844	3 126	2 889	2 815	2 864	449	775	1 049
<i>Porphyra tenera</i>	584	564	609	691	722	674	686	710
<i>Euclima denticulatum</i>	172	259	266	288	233	241	274	214
<i>Sargassum fusiforme</i>	86	78	111	112	152	175	189	190
<i>Spirulina</i> spp.	48	97	73	80	82	86	89	89
Phaeophyceae	30	23	28	17	16	19	30	34
Outras	20	28	27	28	18	15	14	17
Total	13 503	18 992	20 785	23 555	26 863	27 356	29 365	30 139

Até ao ano 2000, a produção Europeia permaneceu estável acima das 350 000 toneladas, contudo, em 2016 a sua produção decaiu para 294 774 toneladas. As principais espécies cultivadas comercializadas no mercado europeu são *Saccharina latissima*, *Alaria esculenta* e *Ulva* sp. Em menor escala são também cultivadas e comercializadas *Porphyra* spp., *Palmaria palmata*, *Codium tomentosum*, *Gracilaria gracilis* e *Laminaria digitata*, que são utilizadas como matérias-primas para a produção de alginatos, alimentos e suplementos para animais, e bioestimulantes vegetais. (Barbier *et al.*, 2019).

1.1.1 Potencial crescimento

A aquacultura continua a apresentar um ritmo de crescimento superior a outros setores de produção de alimentos, sendo que, durante o período 2001-2016, a taxa de crescimento anual da aquacultura foi de 5,8% (FAO, 2018b).

Ao longo dos últimos anos, a China tem dominado o mercado de macroalgas marinhas a nível mundial, como importadora de material bruto e exportadora de

produtos semi-processados e processados. Contudo, têm-se vindo a verificar um crescimento notório da produção, tanto na Ásia como na América Latina, como resposta ao aumento da procura de carragenina e agar. Além disso, tem sido observado um aumento, bastante significativo, do uso de macroalgas como ligantes e espessantes, na indústria de transformação de produtos alimentares na Ásia, América Latina e Médio Oriente (FAO, 2018a).

A produção global de algas marinhas tem aumentado de forma significativa ao longo da última década como resposta à grande procura, tanto a nível de produtos alimentares como não alimentares. A procura por produtos frescos e conservados, incluindo algas marinhas secas para consumo direto, limita-se em grande parte ao mercado do Leste Asiático. Contudo, os produtos hidrocolóides (tais como, carrageninas, agar e alginato) tiveram um maior alcance no mercado consumidor global, no que diz respeito a produtos alimentares e não alimentares (FAO, 2018a).

Dos produtos processados de algas marinhas, a carragenina é a mais utilizada, possuindo diversas aplicações. O seu comércio internacional está estimado em 120 000 toneladas. Ainda que os maiores mercados sejam na União Europeia e Estados Unidos da América, a procura por carragenina continua em crescimento, sobretudo pelos países não produtores. Esta tendência é possível que se expanda a outros países desenvolvidos. As perspetivas de mercado para as carrageninas são favoráveis, com um crescimento estimado em diversos novos mercados e segmentos de mercado (FAO, 2018a).

1.4 Produção de macroalgas em Portugal

1.4.1 Valores

Em 2017, a produção aquícola em Portugal gerou uma receita de 83,2 milhões de euros, produzindo 12 549 toneladas de organismos. Face a 2016, é possível verificar um aumento em quantidade (11 259 toneladas em organismos, +11,5%) e um aumento na receita gerada (75,2 milhões de euros, +10,6%) (INE, 2019).

A produção de macroalgas ocorreu apenas em sistemas semi-intensivos, produzindo no total de 30 toneladas de biomassa e gerando 262 milhares de euros. Sendo que, 28 toneladas corresponderam a macroalgas verdes e 1 tonelada a macroalgas vermelhas (Tabela 3) (INE, 2019).

Em Portugal, a aquicultura de algas marinhas é uma realidade desde 2014, mas existe pouca informação divulgada, por questões de proteção de dados, existindo menos de três empresas a operar nesta área (Barbier *et al.*, 2019).

Tabela 3 – Produção de aquicultura em águas interiores e oceânicas por tipo de água e regime, segundo as espécies (fonte: INE, 2019).

Principais espécies	Águas interiores, marinhas, incluindo as de transição							
	Total		Extensivo		Intensivo		Semi-intensivo	
	t	1000	t	1000	t	1000	t	1000
		€		€		€		€
Algas	30	262	0	0	0	0	30	262
Macroalgas verdes	28	252	0	0	0	0	28	252
Macroalgas vermelhas	1	10	0	0	0	0	1	10

1.4.2 Potencial crescimento

Apesar da indústria de algas ser atualmente pouco significativa em Portugal, o país tem uma longa tradição na exploração e transformação deste recurso. A indústria das algas não pode depender apenas da exploração dos recursos naturais e consequentemente das flutuações anuais da disponibilidade e qualidade da biomassa. Em contrapartida, o cultivo de macroalgas em tanques permite um maior controlo tanto sobre a quantidade de biomassa produzida, como também sobre a sua qualidade (Abreu *et al.*, 2016).

A localização geográfica da costa continental portuguesa, permite a existência de uma ampla variedade de *habitats*, sendo por isso considerada uma das regiões mais ricas em termos biológicos, nomeadamente pela qualidade das suas águas e pela diversidade das espécies existentes (DGRM, 2015). Com o aumento das restrições à pesca extrativa e com a mais valia da sua localização geográfica, Portugal evidencia um enorme potencial na produção aquícola.

O objetivo estratégico nacional para o período de 2014-2020 visa: “Aumentar e diversificar a oferta de produtos da aquicultura nacional, tendo por base princípios de sustentabilidade, qualidade e segurança alimentar, para satisfazer as necessidades de consumo e contribuir para o desenvolvimento local e para o fomento do emprego” (DGRM, 2015).

O aumento da produção aquícola das atuais 12 000 toneladas para cerca de 35 000 toneladas, prevista para 2023, pressupõe o uso sustentável dos recursos naturais, mitigando eventuais efeitos que possam decorrer dos sistemas de cultivo mais intensivos, mas especialmente apostando em culturas:

- a) De organismos filtradores (mexilhões e ostras) a qual, não sendo objeto de fornecimento de alimentos, justifica o grande aumento da produção previsto;

- b) Localizadas em áreas delimitadas pela administração que, pelo hidrodinamismo local, regimes de ventos, correntes e marés facilmente dispersam eventuais efluentes;
- c) Multi-tróficas, que associem diferentes tipos de organismos, peixes, filtradores e algas, minimizando o impacto no ambiente da administração de alimento (DGRM, 2015).

1.5 Sistemas de Produção

Existe uma ampla variedade de métodos de cultivo de algas marinhas. As espécies de algas para cultivo são escolhidas de acordo com:

- a) A localização das instalações de cultivo, que pode ser em mar aberto, em terra, em águas frias de uma zona temperada ou em águas quentes dos trópicos;
- b) A produtividade e a adaptabilidade da espécie, que pode ser de lento ou rápido crescimento, adaptada a elevada exposição luminosa, capacidade de habitar em águas oligotróficas ou exigir elevados níveis de nutrientes na água;
- c) As características dimensionais do ecossistema aquático (tamanho e profundidade);
- d) Fatores como irradiância, condições de temperatura, enriquecimento de nutrientes, poluição, movimento da água e grau da ação das ondas (Titlyanov & Titlyanov, 2010).

O método de cultivo é selecionado de acordo com a relação custo/eficácia e com a aplicação das algas marinhas produzidas (para consumo humano, para alimento de organismos marinhos, como fonte de substâncias para a produção de polissacarídeos, medicamentos, etc) (Titlyanov & Titlyanov, 2010).

As algas marinhas cultivadas de forma extensiva, ocorrem em áreas naturais, utilizando a luz, o calor, a energia do movimento da água e os nutrientes disponíveis naturalmente na água. Os métodos de cultivo extensivo podem ser subdivididos em dois grupos: (1) os que exploram comunidades de algas que ocorrem de forma natural, aplicando técnicas que aumentem a sua produtividade, que suportem a sua estabilidade estrutural e que as proteja de impactos negativos de fatores naturais ou antropogénicos; além disso, utilizam o planeamento estratégico e estimam o máximo de colheita admissível, que não irá causar a degradação dos ecossistemas; (2) e os que introduzem culturas de espécies nativas ou não-nativas em biocenoses naturais, provocando a

alteração ou a degradação dos biocenoses, que são substituídos por comunidades artificiais que são dominadas pelas espécies de algas em cultivo (Titlyanov & Titlyanov, 2010).

Os métodos de cultivo intensivo de algas marinhas podem ser aplicados em pequenas massas de água naturais, tais como esteiros, lagos e lagoas, nos quais são aplicados fertilizante orgânicos e inorgânicos, e técnicas para controlo e remoção de epífitas, através da regulação da luz e do movimento da água ou em tanques utilizando luz natural ou artificial, nutrientes e fitohormonas. Estas técnicas de cultivo podem encontrar-se associadas a sistemas de policultura e de Aquacultura Multi-Trófica Integrada (IMTA) (Titlyanov & Titlyanov, 2010).

Métodos de cultivo:

Cultivo em linha

As algas marinhas são fixas a cordas, de diversos comprimentos (de 10m a 50m, ou maiores), que são colocadas paralelamente e espaçadas entre si, dependendo do tamanho das algas marinhas no momento da colheita (Figura 1) (Radulovich *et al.*, 2015). A profundidade à qual são colocadas varia de acordo com o seguinte:

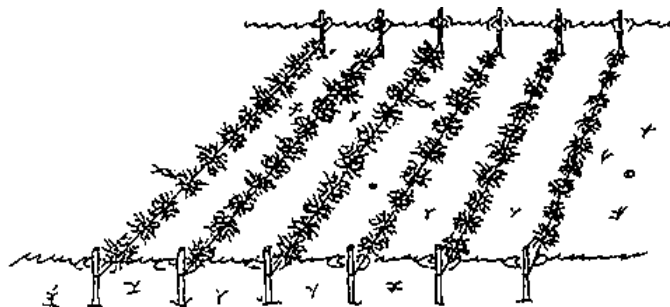


Figura 1 - Cultivo em linha: Método de cultura de *Eucheuma* praticado nas Filipinas (Alih, 1989).

a) Off-bottom

Plantadas perto do fundo da zona costeira, de preferência, com uma diferença de um mínimo de 0,3m, no topo aquando da maré mais baixa. Este método é amplamente utilizado com espécies de pequenas dimensões e/ou espécies que são colhidas com frequência, tais como, *Eucheuma* e *Kappaphycus* (Radulovich *et al.*, 2015).

b) *Submerged hanging line*

As algas são plantadas a meia água, perto da costa, ficando submersas a alguns metros de profundidade durante as marés altas e expostas ao ar durante as marés baixas, tais como *Eucheuma* e *Gracilaria* (Radulovich *et al.*, 2015).

c) *Floating line (long-line)*

As algas são plantadas ou à superfície ou perto dela, sendo que as algas ficam ligeiramente submersas, ou seja, não ficam completamente expostas. Como tal, este método é completamente independente da profundidade. É bastante utilizado no cultivo de *Laminaria japonica* (Radulovich *et al.*, 2015).

Cultivo em rede

Os propágulos das algas marinhas são fixos a redes e dispostos a uma determinada profundidade de água. Por norma, flutuam à superfície ou são ligeiramente submersas (Figura 2) (Radulovich *et al.*, 2015).

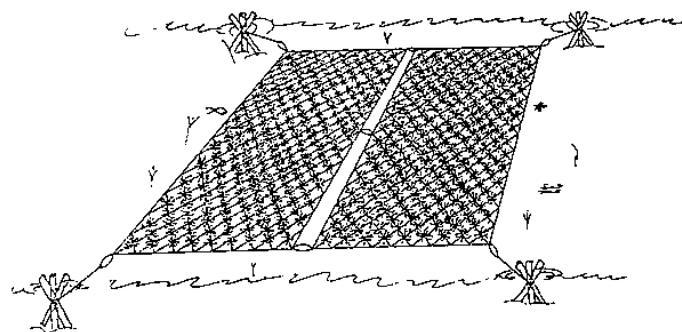


Figura 2 - Cultivo em rede: Método de cultura de *Eucheuma* praticado nas Filipinas (Alih, 1989).

Cultivo em jangadas flutuantes

As algas marinhas são fixas a linhas ou a redes, com o formato de uma estrutura rígida e flutuante, construída a partir de bambu ou outro material. Esta estrutura é colocada à superfície da coluna de água (Figura 3) (Radulovich *et al.*, 2015).

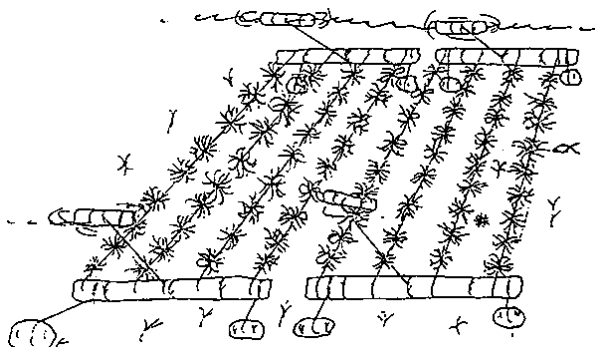


Figura 3 - Jangadas flutuantes: Método de cultura de *Eucheuma* praticado nas Filipinas (Alih, 1989).

Cultivo em tanques ou esteiros

A cultura em tanques permite o controle das condições ambientais, sendo um parâmetro bastante importante sobretudo para as espécies mais delicadas para o mercado fresco e/ou para a produção intensiva. As algas marinhas podem ser amarradas ou podem encontrar-se em *free-floating*. A produção de algas permite a biofiltração dos efluentes dos tanques das pisciculturas, de forma a remover o excesso de nutrientes da água (Radulovich *et al.*, 2015).

1.5.1 Cultivo em Portugal

Em Portugal, o cultivo de espécies marinhas e salobras iniciou-se em águas interiores costeiras, em estuários e lagoas costeiras, num regime de produção extensivo, reaproveitando infraestruturas da indústria de sal (DGRM, 2015).

Atualmente, a maioria da produção aquícola em Portugal é desenvolvida em sistemas de cultivo extensivo e semi-intensivo. Estes regimes de cultivo dependem sobretudo de processos naturais, sendo por isso, caracterizados por baixos níveis de produção comparativamente com os sistemas intensivos. São regimes praticados de uma forma mais sustentável, tanto a nível ambiental como a nível socioeconómico das comunidades (Abreu *et al.*, 2016).

É bastante exequível complementar os sistemas semi-intensivos com o conceito de Aquacultura Multi-trófica Integrada. Sendo o espaço um dos constrangimentos para o estabelecimento de aquaculturas, existem em Portugal centenas de hectares de antigas salinas (espaços que, durante décadas, foram dedicados à produção de sal) subaproveitadas. A implementação de sistemas IMTA poderá ser uma realidade nesses locais (Abreu *et al.*, 2016).

Em Portugal, a produção sustentável de algas marinhas e de produtos à base de algas marinhas, é realizada no conceito IMTA, cultivando as algas marinhas com proximidade a diversas espécies de diferentes níveis tróficos, permitindo a redução de resíduos da aquacultura. Esta produção é realizada num ambiente controlado em terra, com certificação orgânica para a qualidade, rastreabilidade, estabilidade de fornecimento e uma pegada ecológica reduzida (Buschmann *et al.*, 2017).

1.6 Estado Mundial das Pescas e Aquacultura

Com as estimativas de que em 2050 se alcancem os 9 772 milhões de habitantes (United Nations, 2017), a sociedade enfrenta o desafio de ser capaz de fornecer alimentos e meios de subsistência a toda a população. Além disso, as alterações

climáticas e a degradação ambiental, têm vindo a provocar efeitos negativos nos recursos disponíveis (FAO, 2018b). Como tal, é necessário encontrar alternativas e soluções que, perante este cenário, permitam assegurar a quantidade necessária de alimento, bem como de proteínas e de nutrientes essenciais à dieta do Homem. A FAO (2018b) reconhece o papel fundamental da pesca e da aquacultura para assegurar a segurança alimentar e nutricional no contexto das alterações climáticas, especialmente nos países em desenvolvimento.

O rápido crescimento da população mundial levou ao aumento da procura do pescado e, em consequência, foi-se verificando uma pressão pesqueira cada vez mais acentuada, culminando numa pesca excessiva observada em todo o mundo nos dias de hoje (Tacon & Metian, 2015). Esta exploração insustentável, para além de ameaçar o equilíbrio dos ecossistemas marinhos, provoca perda de diversidade e danos ambientais. Como tal, é necessário encontrar alternativas mais sustentáveis capazes de suprir a crescente necessidade de pescado.

Em 2016, o consumo mundial de pescado *per capita* superou 20,3 kg, mais do dobro do valor consumido na década de 1960. Nesse mesmo ano, foram produzidos em aquacultura 54,1 milhões de toneladas de peixes (49,1%), 17,1 milhões de toneladas de moluscos (15,56%) e apenas 7,9 milhões de toneladas de crustáceos (7,14%). No total, foram produzidas 80,0 milhões de toneladas de pescado e 30,1 milhões de toneladas de plantas aquáticas (FAO, 2018b).

O aumento do consumo de pescado deve-se à estabilidade dos valores de pescado capturado verificada desde o final dos anos 80, assim como, devido à redução dos desperdícios e ao aumento da produção em aquacultura. Atualmente, 47% do pescado destinado ao consumo humano é produzido em aquacultura. Sendo que, em 37 países, verificou-se que a produção de pescado em aquacultura superou os valores do pescado capturado em meio natural. Estima-se que, em 2024, a produção em aquacultura cresça quase 20%, ultrapassando o volume total das pescas. Os principais produtores foram a Índia, a Indonésia, o Vietname, o Bangladesh, o Egipto e a Noruega (FAO, 2018b).

Contudo, o crescimento exponencial deste setor de produção tem vindo a contribuir para um aumento excessivo de nutrientes nos ecossistemas aquáticos, sobretudo de azoto e fósforo (Beveridge, 1996; Marinho-Soriano, *et al.*, 2009). Estes compostos são libertados no meio devido à fertilização dos tanques, à alimentação das espécies em cultivo e aos resíduos metabólicos produzidos pelos organismos (Chopin *et al.*, 2001; Neori *et al.*, 2004).

1.7 Sistemas de Aquacultura Multi-trófica Integrada

O rápido crescimento da aquacultura tem sido acompanhado por um aumento nos impactos ambientais. A produção intensiva de peixes, que implica o fornecimento de ração e medicação, é uma das principais responsáveis por estes danos observados. Os efluentes resultantes da produção intensiva encontram-se repletos de ração não ingerida e de fezes, ou seja, quando estes são lançados para o ambiente, possuem uma elevada quantidade de nutrientes (orgânicos e inorgânicos) e compostos químicos das medicações fornecidas (Read & Fernandes, 2003). Como tal, tem vindo a ser proposto a aplicação de Sistemas de Aquacultura Multi-trófica Integrada, com o objetivo de mitigar os efeitos do enriquecimento de nutrientes observados nos sistemas de aquacultura.

Nos sistemas de IMTA, as excreções, de uma ou mais espécies, são utilizados por outras culturas de espécies de diferentes níveis tróficos (Shpigel *et al.*, 2017). As algas, por exemplo, assimilam o azoto (em forma de amónia e/ou nitratos), o fósforo (em forma de fosfatos) e o carbono (em forma de dióxido de carbono) libertados para o meio pelo normal metabolismo dos peixes, ou outros organismos em cultivo, convertendo estes compostos em biomassa potencialmente útil (Abreu *et al.*, 2011), proporcionando uma fonte de alimento autossuficiente (FAO, 2018b). Com este tratamento, os efluentes podem retornar aos tanques de peixes, ou então ser lançados para o meio natural sem comprometer o ambiente e reduzindo o impacto ambiental (Figura 4) (Abreu *et al.*,



A) Nutrientes inorgânicos dissolvidos + energia solar + dióxido de carbono.

B) Biorremediação, assimilação de azoto e fósforo.

Figura 4 - Exemplo de um esquema de um sistema IMTA no qual as setas indicam o percurso dos recursos (ex, nutrientes e energia) entre os possíveis componentes.

2011). Aquacultura Multi-trófica Integrada tem vindo a ser utilizada, com sucesso, para melhorar a qualidade nutricional da biomassa das algas marinhas (Araújo *et al.*, 2016).

Níveis elevados e constantes de azoto, fósforo e dióxido de carbono, nos efluentes de pisciculturas, permitem que as algas em cultivo obtenham taxas de produtividade superiores às das populações naturais ou de sistemas de cultivo naturais (Abreu *et al.*, 2016).

As algas marinhas cultivadas em sistemas IMTA, apresentam maiores níveis de produtividade e menos variabilidade em teor proteico, em comparação com as algas marinhas presentes no seu meio natural, devido ao fornecimento contínuo de nutrientes e à mínima perturbação por herbívoros e epífitas (Schuenhoff *et al.*, 2003; Mata *et al.*, 2010; Abreu *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2015).

A escolha da espécie de alga marinha a incluir num sistema IMTA deve ser realizada em função dos seguintes critérios:

- a) Elevada taxa de crescimento e concentração em azoto nos tecidos;
- b) Facilidade de cultivo e no controlo do ciclo de vida;
- c) Resistência a epífitas e a organismos patogénicos;
- d) Correspondência entre as características ecofisiológicas e o ambiente de crescimento (Neori *et al.*, 2004).

Além disso, deve-se escolher espécies nativas da região de forma a evitar causar dano ecológico por introdução de organismos não nativos. É claro que, para além destes critérios descritos, a escolha será influenciada pela aplicação pretendida. Isto é, se o foco for o valor da biomassa produzida, no momento de seleção, irá ser tomado em consideração a qualidade do tecido e o valor acrescentado de compostos secundários (como por exemplo, *r*-ficoeritrina). Se, por outro lado, o principal foco for o processo de biorremediação, então tanto o crescimento como a capacidade de captação de nutrientes e seu armazenamento serão fatores determinantes (Neori *et al.*, 2004).

Os sistemas IMTA apresentam um futuro promissor na produção de quantidades comerciais de algas marinhas, para extração de hidrocolóides. Além de, em simultâneo, produzirem peixes e outros organismos marinhos, com interesse comercial, para consumo humano (Bixler & Porse, 2011). Em Israel, as algas marinhas são utilizadas nos sistemas IMTA como biofiltros dos efluentes resultantes dos tanques de cultivo de peixes (Shpigel & Neori, 1996; Neori *et al.*, 2004), economizando o tratamento dos efluentes e, ao mesmo tempo, sendo uma fonte de alimento segura ao longo do ano (Shpigel *et al.*, 2017).

1.8 Macroalgas em rações de peixes

A farinha de peixe constitui uma das principais fontes de nutrientes em rações de peixe de aquacultura. Isto porque, possui um alto teor proteico, um perfil de aminoácidos equilibrado, alta digestibilidade e palatabilidade, e é fonte de ácidos gordos polinsaturados $n - 3$, essenciais (Muzinic *et al.*, 2006).

O uso de farinha de peixe para rações para animais aquáticos, é considerado por alguns, como antiético e insustentável do ponto de vista económico e ambiental. Com os *stocks* das populações de peixes a estagnar, e muitas em declínio, as preocupações da sua disponibilidade no futuro são constantes (Muzinic *et al.*, 2006). Além disso, o rápido crescimento da indústria da aquacultura observado, conduziu em simultâneo, a uma crescente procura na farinha de peixe. Este aumento na procura, teve como consequência, o aumento do preço do produto (Hardy, 2010). A alimentação dos peixes representa mais de 50% dos custos de operação, em aquacultura intensiva (Valente *et al.*, 2006). Como resultado destes fatores, esta indústria tem vindo a investigar soluções que permitam a redução, ou até mesmo, a eliminação do uso de farinha de peixe nas suas dietas. Ingredientes alternativos que se encontrem disponíveis localmente e com um valor nutricional equivalente à farinha de peixe poderão ser uma solução. As abordagens em estudo são então a substituição, parcial ou total, da farinha de peixe por outras potenciais fontes proteicas alternativas, de origem animal e/ou vegetal, mais sustentáveis e mais acessíveis a nível de custo (Muzinic *et al.*, 2006; Hardy, 2010).

As macroalgas são vistas como possíveis candidatas, na substituição parcial da farinha de peixe, reduzindo de forma considerável o custo de produção dos peixes. Além disso, inúmeros estudos relatam efeitos benéficos de rações produzidas com farinha de micro e de macroalgas marinhas, para diversas espécies aquáticas (Shpigel *et al.*, 2017).

Estudos realizados demonstraram que as algas marinhas podem ser uma fonte de nutrientes em rações para aquacultura (Valente *et al.*, 2006; Peixoto *et al.*, 2019). A suplementação de dietas com algas está associada a melhorias na performance de crescimento dos peixes, na resposta imune e na capacidade antioxidante, assim como, na alteração da coloração do músculo (Peixoto *et al.*, 2019). Por exemplo, um estudo realizado demonstrou que a inclusão de 5% de farinha de algas em ração para *Pagrus major* aumenta a taxa de crescimento dos peixes e, em particular, melhora a assimilação de proteínas (Mustafa *et al.*, 1995). Noutro estudo realizado, foi também comprovado

que a inclusão de 5% de *Ulva pertusa* em ração para *Pagrus major*, aumenta a resistência a doenças (Sato *et al.*, 1987).

As algas marinhas com elevado conteúdo proteico e com elevada taxa de produção, estão a ser estudadas como novos alimentos, com potenciais benefícios nutricionais e, como possíveis ingredientes em dietas para peixe (Araújo *et al.*, 2016).

Para além do seu potencial valor nutricional na substituição da proteína, as algas podem também possuir uma contribuição significativa como ligantes ou corantes (Valente *et al.*, 2006). Além disso, demonstram ser uma boa fonte de compostos bioativos, que podem fornecer benefícios fisiológicos para os peixes, atuando como um suplemento alimentar (Araújo *et al.*, 2016).

Diversos estudos têm relatado que as farinhas de algas podem ser utilizadas como ligantes em rações para animais aquáticos. A inclusão de algas em rações resulta numa melhoria da qualidade do *pellet* (hidroestabilidade, capacidade de retenção da água e textura) tendo como consequência, o aumento da ingestão de alimentos, melhoria da eficiência alimentar e, melhoria na qualidade final do produto animal. O nível de inclusão ótimo varia conforme a espécie de alga e a espécie consumidora (Cruz-Suárez *et al.*, 2008).

A maioria dos estudos de nutrição, em peixes, realizados com macroalgas marinhas tem utilizado taxas de inclusão baixas, de forma a estabelecer a sua possível utilidade como suplementos funcionais (efeito ligante), nutricionais e nutracêuticos (Cruz-Suárez *et al.*, 2009).

Contudo, o conteúdo proteico e/ou perfil de aminoácidos, verificado nas algas, pode não atender aos requisitos nutricionais dos peixes. Isto porque, as macroalgas, podem conter substâncias com algum nível de toxicidade e/ou apresentarem fatores antinutricionais, contribuindo para a redução da qualidade nutricional e afetando, de forma negativa, o crescimento dos peixes (de Oliveira *et al.*, 2009).

Estudo realizado em *Oreochromis niloticus* demonstrou que, a inclusão de 10% de farinha de *Gracilaria* sp. na ração, promoveu alterações morfológicas a nível do intestino. Observou-se uma redução significativa tanto no comprimento das vilosidades como no diâmetro do intestino, comparativamente à dieta controlo. Estas alterações morfológicas no intestino, poderão causar redução na sua superfície de absorção que irá diminuir a retenção de nutrientes, e contribuir para uma diminuição da taxa de crescimento dos peixes (Silva *et al.*, 2015).

Por exemplo, vários estudos têm demonstrado que as macroalgas *Porphyra* sp. apresentam um elevado teor de hidratos de carbono, sobretudo do tipo *non-starch polysaccharides* (NSP) (Karsten *et al.*, 1999; McDermid & Stuercke, 2003). A utilização dos hidratos de carbono depende de forma significativa, dos hábitos alimentares da espécie consumidora. Os NSP incluem compostos com celulose, hemicelulose, β -glucano, pectinas e *guar gum*, que pertencem à dieta de peixes herbívoros e omnívoros, mas não à de espécies carnívoras. Contudo, apesar das espécies carnívoras não estarem preparadas para utilizar os NPS, estes compostos são incorporados nas suas dietas, podendo reduzir a utilização de outros nutrientes e, agir como antinutrientes (Krogdahl *et al.*, 2005). Além disso, reduzem a digestão e a absorção dos nutrientes, ou impedindo a ação das enzimas digestivas, ou ligando-se aos ácidos biliares e comprometendo o seu ciclo entero-hepático (Francis *et al.*, 2001).

Por exemplo, um peixe omnívoro (*Lagodon rhomboides*) utiliza os hidratos de carbono solúveis de baixo peso molecular, mas não os hidratos de carbono complexos (Krogdahl *et al.*, 2005). Enquanto que, um estudo realizado com peixes carnívoros, em *Oncorhynchus mykiss* demonstrou que, a inclusão de 10% de farinha de *Gracilaria vermiculophylla* na ração, diminuiu de forma significativa o crescimento dos peixes. Todas as dietas experimentais eram nutricionalmente equilibradas, isoproteicas e isoenergéticas, de acordo com os requisitos nutricionais de *Oncorhynchus mykiss*. Como tal, a diminuição do crescimento observada estará relacionada com a presença de fatores antinutricionais presentes na composição das algas, como NSPs, que afetam o processo de digestão (Araújo *et al.*, 2016).

Como tal, a baixa inclusão de farinha de macroalgas em rações para peixes, pode estar relacionado com o teor de fibra. Isto porque, elevados níveis de fibra, resultam numa passagem mais rápida dos alimentos pelo trato gastrointestinal (Blender, 1967), diminuindo assim, de forma significativa, o tempo disponível para a digestão e, afetando de forma negativa a absorção dos nutrientes presentes na dieta (Shiau, 1997).

Por exemplo, um estudo realizado, com diferentes níveis de inclusão, de farinha de *Ulva rigida* (10, 20 e 30%), em ração para *Oreochromis niloticus*, demonstrou que, a inclusão de farinha de *Ulva rigida* a 30% diminuiu de forma significativa o crescimento dos peixes (Azaza *et al.*, 2008). Isto pode estar relacionado com o elevado teor de fibra, e os seus possíveis efeitos na digestibilidade da proteína e da matéria seca, uma vez que se observa uma redução no crescimento dos peixes, quando o teor em fibra na dieta foi aumentada de 7,06% na dieta controlo para 13,57% na dieta com inclusão de 30% de farinha de *Ulva rigida*. Estes resultados corroboram que, o elevado teor em fibra

nas dietas para peixes, pode ser um fator limitante no que diz respeito à inclusão de farinha de algas em elevados níveis de inclusão. A estrutura da fibra pode reduzir a acessibilidade das enzimas intestinais aos nutrientes presentes nos alimentos, tais como, amido, proteínas e lípidos, atuando assim como barreiras físicas entre os nutrientes e as enzimas digestivas (Potty, 1996), tornando-os menos disponíveis.

Outro estudo realizado com *Clarias gariepinus*, demonstrou também que elevadas inclusões de *Ulva* na dieta (20 e 30%), diminui de forma significativa o crescimento dos peixes (Abdel-Warith *et al.*, 2016). Os autores atribuem esta diminuição de crescimento à presença de fatores antinutricionais, tais como, saponinas, taninos e ácido fítico, que podem ser responsáveis pela redução da palatabilidade das dietas (Francis *et al.*, 2001). Estes compostos com características antinutricionais podem, portanto, inibir o desempenho de crescimento dos peixes e a utilização dos alimentos, quando alimentados com dietas com altos níveis de algas na sua composição (Abdel-Warith *et al.*, 2016).

1.9 Extratos de algas nas rações de peixes

Uma vez que inclusão de farinha de algas em dietas é limitada pelo seu teor em hidratos de carbono, uma solução que tem vindo a ser estudada e proposta, é a inclusão de extratos de algas nas rações pra peixe. Isto porque, para além da sua riqueza em minerais e vitaminas (Holdt & Kraan, 2011), as algas, contêm substâncias bioativas como polissacarídeos, proteínas, lípidos e polifenóis, com propriedades antibacterianas, antivirais e antifúngicas, entre outras (Kumar *et al.*, 2008). O que lhes confere um elevado potencial como suplemento, em dietas funcionais ou para a extração de compostos. As paredes celulares das algas marinhas possuem uma matriz de polissacarídeos, constituída por açúcares neutros e ácidos, encontrados também nas plantas terrestres. Além disso, as algas marinhas, possuem polissacarídeos sulfatados, ao contrário da maioria das plantas terrestres (Percival, 1979; Castro *et al.*, 2006). A forma como os açúcares se ligam aos grupos sulfatados, permitem a formação de uma ampla variedade de moléculas com diferentes propriedades biológicas incluindo, atividade antiviral, anticoagulantes, antitumorais e imunomoduladores (Castro *et al.*, 2006).

As algas marinhas apresentam também uma atividade antioxidante, que pode surgir de pigmentos como as clorofilas e os carotenoides; de vitaminas e de precursores de vitaminas, incluindo α -tocoferol, β -caroteno, niacina, tiamina e ácido ascórbico; de fenóis, como a colina; terpenóides; peptídeos e outras substâncias antioxidantes. Esses

compostos contribuem direta ou indiretamente, na inibição ou supressão da produção de radicais livres (Holdt & Kraan, 2011).

Vários estudos têm vindo a ser realizados para averiguar se as dietas contendo macroalgas podem ter propriedades funcionais, com o objetivo de melhorarem a performance dos peixes, tornando-os mais resistentes a doenças.

Os extratos de algas marinhas utilizados em rações para peixes, sobretudo os derivados de polissacarídeos, possuem a capacidade de modificar a atividade de alguns componentes do sistema imunitário e aumentar a proteção dos organismos, contra determinadas doenças (Castro *et al.*, 2004). Por exemplo, a administração de alginato de sódio ou de k-carragenina, aumenta a resposta imune inata de indivíduos da espécie *Epinephelus fuscoguttatus* e a sua resistência a *Vibrio alginolyticus* (Cheng *et al.*, 2008).

O polissacarídeo fucoidano, possui a capacidade de estimular o mecanismo imune inato, ativando macrófagos e células NK (*natural killers cells*) através de diferentes recetores. Além disso, são capazes de conectar o mecanismo de defesa imune adaptativo pelas citoquinas que, por sua vez, irão estimular os leucócitos a dirigirem-se em quantidade para o local de infeção. As *natural killers cells*, desempenham um papel bastante importante na resposta imune pois são capazes de destruir células que se encontrem infetadas por vírus. Como tal, extratos da alga *Sargassum wightii* ricos em fucoidano melhoraram vários parâmetros imunológicos tais como, atividade de explosão respiratória, atividade da lisozima, atividade fagocítica e na contagem total de leucócitos em *Pangasianodon hypophthalmus* (Prabu *et al.*, 2016).

Os compostos bioativos das algas marinhas podem também atuar como prebióticos. Os prébióticos promovem mudanças específicas tanto na composição como na atividade da microbiota gastrointestinal, resultando em benefícios para o bem-estar do organismo. Por exemplo, os agares, que são polissacarídeos extraídos de diversas famílias de algas marinhas, foram estudados como possíveis prebióticos. Estudo realizado em *Pangasius bocourti* demonstrou que a dieta com agar de baixo peso molecular estimulou o desempenho do crescimento, imunidade e resistência a doenças (Van Doan *et al.*, 2014).

O uso de compostos bioativos naturais capazes de aumentar a resistência a doenças é também importante para minimizar o uso de fármacos contra organismos patogénicos em aquacultura, devido ao risco de se desenvolver resistência a antibióticos. Estudo realizado demonstrou que a adição de extrato bruto *Asparagopsis*

sp. à dieta comercial de *Penaeus monodon* é bastante eficaz no controle de infeções provocadas por *Vibrio* (Manilal *et al.*, 2012).

1.10 Peixe-zebra (*Danio rerio*; Hamilton, 1822)

Tabela 4 – Classificação taxonómica de *Danio rerio* (fonte: <https://www.fishbase.de/>).

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Classe	Actinopterygii
Ordem	Cypriniformes
Família	Cyprinidae
Género	Danio
Espécie	<i>Danio rerio</i> (Hamilton, 1822)

Os peixes-zebra apresentam dimorfismo sexual ao longo do seu crescimento, sendo que, ambos os sexos podem ser distinguidos devido à diferença de tamanho, forma e pigmentação. Embora estas diferenças sejam difíceis de ser observadas em indivíduos juvenis, em adultos são facilmente detetadas. Os machos são geralmente mais pequenos, em comparação às fêmeas, apresentando um corpo mais alongado com riscas douradas e azuis. Por outro lado, as fêmeas apresentam maiores dimensões, com um corpo mais arredondando, com o abdómen esbranquiçado, riscas prateadas e azuis e apresentam uma pequena papila genital na frente da barbatana anal (Figura 5) (Parichy *et al.*, 2009).

Em condições típicas de laboratório (28,5°C e 14:10 horas de luz-escuridão), os peixes-zebra desenvolvem-se bastante rápido. A embriogénese demora 24 horas pós-fertilização (Dahm, 2006; Ulloa *et al.*, 2011). As larvas eclodem dentro de 2.5 – 3 dias pós-fertilização e, a metamorfose (transição de larva para juvenil) ocorre cerca de 30 dias pós-fertilização (Kimmel *et al.*, 1995; Ulloa *et al.*, 2011).



Figura 5 – *Danio Rerio* (fonte: <https://www.fishbase.de/>).

A maturidade sexual é alcançada entre as 10 e as 14 semanas após a fertilização. Em condições favoráveis, estes peixes desovam continuamente após ocorrer a maturação sexual. A sua elevada capacidade de reprodução e o seu pequeno intervalo de tempo de geração (12 a 14 semanas), serve como uma vantagem em

relação a espécies de peixes que apresentam um longo intervalo de geração (como por exemplo, os salmonídeos, que possuem um intervalo de geração entre 2 a 4 anos, dependendo da espécie) (Ulloa *et al.*, 2011).

1.10.1 Peixe-zebra como modelo experimental

De uma forma geral, um peixe é definido como um bom modelo experimental, para investigações relacionadas com a aquacultura, quando, devido às suas características, é considerado como sendo representativo de um largo grupo de organismos. Para tal, deve possuir as seguintes características:

- a) Ter as características biológicas básicas, possuídas pelas espécies cultivadas mais importantes;
- b) Exibir respostas fisiológicas similares às das espécies cultivadas;
- c) Possuir um ciclo de vida curto, e, ser fácil e económico de se reproduzir em laboratório;
- d) Possuir muitos recursos (estirpes, recursos genómicos, transgénicos, etc.) que facilitam a sua investigação na maioria das áreas (Ribas & Piferrer, 2014).

O peixe-zebra é um importante modelo experimental utilizado em diversos campos da ciência, nomeadamente: doenças humanas, desenvolvimento da biologia e genética, toxicologia ambiental, análise de drogas, evolução e, cada vez mais frequentemente, na aquacultura (Lawrence *et al.*, 2012). Devido às suas características, têm vindo a ser propostos a ser utilizados em estudos de nutrição e crescimento de peixes (Ribas & Piferrer, 2014).

Estes organismos apresentam diversas características que o tornam um ideal vertebrado como modelo experimental em investigação na aquacultura:

- a) Tamanho pequeno;
- b) Fácil reprodução;
- c) Pequenos intervalos de geração (12-14 semanas);
- d) Capacidade de produzir um número elevado de descendentes;
- e) Os embriões são transparentes;
- f) Desenvolvimento inicial é bem caracterizado;
- g) Fáceis de manipular em laboratório (Aleström *et al.*, 2006; Ulloa *et al.*, 2011).

1.11 *Fucus vesiculosus* (Linnaeus, 1753)

Tabela 5 – Classificação taxonómica de *Fucus vesiculosus* (fonte: <http://www.algaebase.org/>).

Reino	Chromista
Filo	Ochrophyta
Classe	Phaeophyceae
Ordem	Fucales
Família	Fucaceae
Género	<i>Fucus</i>
Espécie	<i>Fucus vesiculosus</i> (Linnaeus, 1753)

Fucus vesiculosus é uma alga marinha castanha, com cor variável entre verde-oliva e verde castanho-avermelhado (Figura 6). Por norma, alcança 0,40m de comprimento, podendo crescer até 2m. Esta alga castanha é caracterizada por possuir bexigas de ar, que são umas vesículas pequenas e esféricas cheias de ar, presentes aos pares. Estas estruturas mantêm as algas a flutuar na direção da luz, potencializando a capacidade de fotossíntese da alga (Rodrigues, 2015).



Figura 6 - *Fucus vesiculosus* (Linnaeus, 1753) (fonte: <http://www.algaebase.org/>).

Crescem e aderem a rochas, em zonas costeiras expostas. Estas algas castanhas encontram-se nas costas do Mar do Norte, do Mar Báltico Ocidental, bem como no Oceano Atlântico e no Oceano Pacífico (Kim, 2012). Em Portugal, encontra-se no litoral norte (Rodrigues, 2015).

O ciclo de vida de *Fucus vesiculosus* é diplonte, isto é, as estruturas reprodutivas femininas e masculinas encontram-se em indivíduos separados. Os gametas são produzidas no interior de receptáculos que se encontram na extremidade do talo. Cada receptáculo possui diversos conceptáculos (Graham *et al.*, 2008).

Os oogónios (gametângios femininos) são produzidos nos conceptáculos de exemplares femininos, sendo que, cada oogónio produz oito óvulos haplóides (n), após a meiose. Quando a planta alcança a maturidade, as camadas da parede celular desta estrutura reprodutiva rompem e libertam os óvulos para o ambiente. Os espermatozoides são biflagelados haplóides (n) e são produzidos no anterídio (gametângio masculino) após a meiose e sucessivas mitoses, originando num total de 64 espermatozoides. Os anterídios encontram-se nos conceptáculos dos exemplares masculinos. Quando os espermatozoides são libertados para o meio ambiente, são atraídos por uma substância química libertada pelos óvulos (feromona fucoserratenos) que os conduz até aos mesmos. Contudo, esta atração apenas é eficaz quando a distância entre os gametas masculinos e os gametas femininos são entre micrômetros e milímetros. Assim que o espermatozoide fertiliza o óvulo, o óvulo fertilizado (diplóide $2n$) envolve-se numa parede para evitar a poliespermia (fertilização de um mesmo óvulo

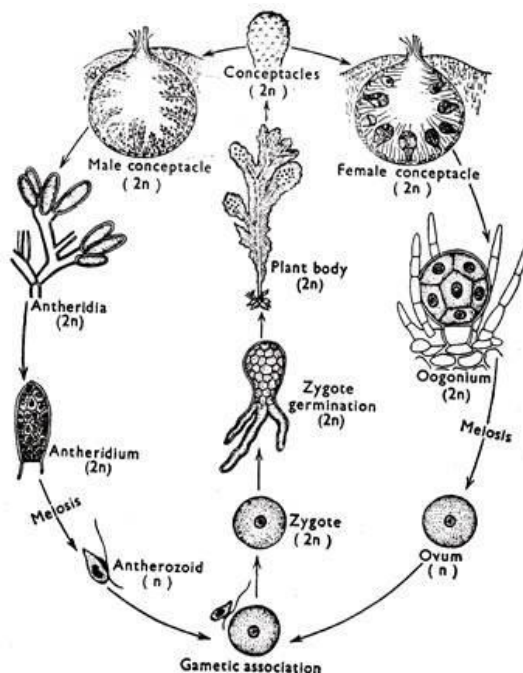


Figura 7 - Ciclo de vida do género *Fucus* mostrando diferentes estágios de desenvolvimento (fonte: <http://www.biologydiscussion.com/algae/classification-of-fucales-with-diagram-algae/58105>).

por mais do que um espermatozoide) que é letal para o embrião (Graham *et al.*, 2008; Feis, 2010).

Os zigotos (diplóides, $2n$) formados afundam rapidamente na coluna de água. Como a sua parede celular inicial é pegajosa, permite que os zigotos adiram em quase todos os substratos com os quais entrem em contacto. Após a sua fixação, o zigoto sofre diversas mitoses até originar, eventualmente, um novo gametófito diplóide ($2n$) (Figura 7) (Feis, 2010).

1.11.1 Potenciais aplicações e interesse económico

Esta alga marinha é utilizada como alimento no Japão e como aditivo ou flavorizante em vários produtos alimentares na Europa. Os extratos de fucoidano, obtidos desta alga marinha, têm vindo a ser cada vez mais estudados devidos às suas atividades biológicas e da sua potencialidade em aplicações médicas (Kim, 2012).

Fucus vesiculosus é uma alga utilizada para consumo humano devido ao seu teor em proteínas, minerais, iodo, vitaminas e ácidos gordos mono e polinsaturados. Além disso, possuem uma forte componente de polissacarídeos não digeríveis (fibra dietética) e polifenóis, que demonstram possuir um efeito positivo sobre o metabolismo do colesterol e sobre a pressão arterial. Os polissacarídeos não digeríveis são fucanos, alginatos, laminaranos celulose e fucoidano (o polissacarídeo predominante). Estes compostos demonstram possuir uma elevada capacidade antioxidante (Diaz-Rubio *et al.*, 2011).

O género *Fucus* apresenta ser um biomarcador adequado de contaminação ambiental em estuários e zonas costeiras. Possui a capacidade de discriminar áreas com diferentes níveis de poluição devido à presença da família de enzimas glutathione-S-transferase, que possuem uma função determinante em processos de destoxificação, catalisando a conjugação de vários xenobióticos com a glutathione (Cairrao *et al.*, 2004).

1.12 *Gracilaria* sp.

Tabela 6 – Classificação taxonómica de *Gracilaria* sp (fonte: <http://www.algaebase.org/>).

Reino	Plantae
Filo	Rhodophyta
Classe	Florideophyceae
Ordem	Gracilariales
Família	Gracilariaceae
Género	Gracilaria

As espécies do género *Gracilaria* são algas marinhas vermelhas. Os indivíduos apresentam uma textura cartilaginosa, corpos cilíndricos, ramificados e um pouco achatados. Possuem uma estrutura uniaxial, e crescem a partir de uma única célula apical (Figura 8) (Graham *et al.*, 2008).

O género *Gracilaria* (Rhodophyta) ocorre de forma natural, em zonas costeiras tropicais e subtropicais (Marinho-Soriano *et al.*, 2007). Por norma, cresce em grandes aglomerados, em lagoas ou baías pouco profundas e túrbidas (Graham *et al.*, 2008).



Figura 8 - *Gracilaria vermiculophylla* (fonte: <http://www.algaebase.org/>).

A maioria das populações do género *Gracilaria* possuem um ciclo de vida do tipo *polysiphonia*. Ou seja, as fases tetrasporófitas (diplóides, $2n$) e gametófitas (haplóides, n) são morfologicamente idênticas. Além disso, verifica-se que na fase gametófito existe o mesmo número de indivíduos femininos e de indivíduos masculinos (Figura 9). O gametófito masculino liberta os seus gâmetas masculinos (*spermatia*), que vão fertilizar, *in situ*, os gâmetas femininos. Para que a fusão dos gâmetas ocorra com sucesso, é necessário que os indivíduos se encontrem próximos (Kain & Destombe, 1995).

O zigoto formado, desenvolve-se como uma terceira fase, o chamado carposporófito (diplóide, $2n$). Esta estrutura consiste numa massa de filamentos capaz

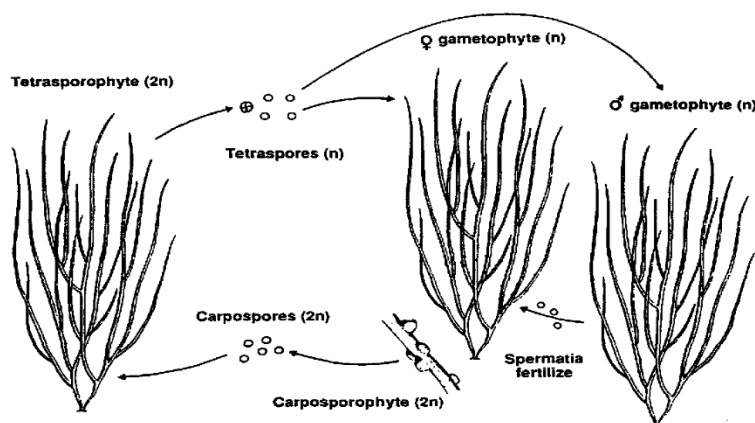


Figura 9 - O ciclo de vida da *Gracilaria* (Kain e Destombe, 1995).

de produzir uma enorme quantidade de esporos (carpósporos, diplóides) (Graham *et al.*, 2008), e é completamente dependente do gametófito feminino. Os carpósporos resultantes, são produto de uma única fusão de gâmetas, sendo por isso, todos geneticamente idênticos (Kain e Destombe, 1995).

Quando maduros, os carpósporos são libertados na água, fixam-se e germinam, dando origem a uma segunda geração, multicelular e diplóide ($2n$), o tetrásporófito. O tetrásporófito desenvolve-se através de sucessivas mitoses e citocineses que ocorrem no carpósporo que lhe deu origem. Por norma, são estruturas de vida livre, pelo que, são independentes dos gametófitos e dos carposporófitos (Graham *et al.*, 2008).

Quando os tetrásporófitos se encontram maduros, produzem tetrásporos nos tetrásporângios. Os tetrásporângios desenvolvem-se pela modificação da célula apical da ramificação (Graham *et al.*, 2008). A reprodução envolve o processo de meiose, dando origem a 4 tetrásporos (haplóides, n), geneticamente variáveis (Kain & Destombe, 1995).

1.12.1 Potenciais aplicações e interesse económico

A nível mundial, a *Gracilaria*, em 2016, apresentou ser o terceiro género de algas mais cultivado, alcançando aproximadamente os 4,15 milhões de toneladas em peso fresco (FAO, 2018b).

É uma das algas marinhas mais cultivadas e com maior valor económico a nível mundial. A sua importância económica deve-se, sobretudo, à indústria ficocolóide, sendo a principal fonte de agar (Abreu *et al.*, 2011). Datada de meados do século XVII, a primeira fonte de agar, o *Gelidium* do Japão, contudo, no início do século XX, a procura por este ficocolóide excedeu a disponibilidade desta alga. Desde então, a *Gracilaria* tem possuído um papel importante na produção de agar (Armisen, 1995).

A maioria das espécies deste género são eurialinas e euritermais. Além disso, apresentam um rápido crescimento e uma taxa de captação de nutrientes elevada, em condições em que o meio possua elevadas concentrações de nutrientes (Briggs & Funge-Smith, 1996). Como tal, funcionam bastante bem como biofiltros, removendo amónia e nitratos de efluentes de esgotos e piscícolas (Briggs & Funge-Smith, 1996; Abreu *et al.*, 2011).

Na China, estas algas vermelhas têm vindo a ser utilizadas na alimentação humana e em técnicas de medicina tradicional há mais de 1 000 anos. Isto porque fornecem fibras dietéticas, alto teor proteico, baixo nível em calorias e gordura (Peng *et al.*, 2009). Possuem um elevado conteúdo de minerais, vitaminas e compostos bioativos, compostos essenciais em rações para aquacultura (Peixoto *et al.*, 2019). Além disso, possuem um forte potencial como fonte nutricional de baixo custo, tanto para humanos como para animais (Briggs & Funge-Smith, 1996).

Estas algas vermelhas são ricas em polifenóis e polissacarídeos sulfatados. Estes compostos reduzem o ataque de radicais livres nos tecidos, minimizando o *stress* oxidativo. Como tal, dietas suplementadas com estas algas, aparentam ajudar a prevenir a oxidação de peixe embalado, até mesmo depois da congelação, aumentando assim, o seu prazo de validade (Peixoto *et al.*, 2019).

Este género de algas tem sido considerado, uma das candidatas mais promissoras, como fonte alternativa de nutrientes em dietas para espécies produzidas em aquacultura, principalmente gastrópodes herbívoros, mas, também, ouriços-do-mar, peixes e camarões (Marinho-Soriano *et al.*, 2007).

Algas do género *Gracilaria* são caracterizadas pelos seus pigmentos fotossintéticos, tais como, clorofila α , carotenoides (β -caroteno, luteína, zeaxantina, fucoxantina, luteína e anteraxantina) e ficobilinas (R-ficocianina e R-ficoeritrina). Estes pigmentos naturais, podem ser utilizados nas dietas como potenciais substitutos dos corantes artificiais utilizados atualmente na indústria alimentar (Peixoto *et al.*, 2019). Por exemplo, contribuem para a pigmentação do músculo e da pele de salmonídeos, o que, para os consumidores, é um parâmetro bastante significativo no momento da compra (Araújo *et al.*, 2016).

1.13 *Porphyra dioica* (J. Brodie & L.M. Irvine, 1997) e *Porphyra umbilicalis* (Kützinger, 1843)

Tabela 7 – Classificação taxonómica de *Porphyra dioica* e *Porphyra umbilicalis* (fonte: <http://www.algaebase.org/>).

Reino	Plantae
Filo	Rhodophyta
Classe	Bangiophyceae
Ordem	Bangiales
Família	Bangiaceae
Género	<i>Porphyra</i>
Espécie	<i>Porphyra dioica</i> (J. Brodie & L.M. Irvine, 1997) <i>Porphyra umbilicalis</i> (Kützinger, 1843)

As espécies *Porphyra dioica* e *Porphyra umbilicalis* são algas marinhas vermelhas. A fase laminar da *Porphyra umbilicalis* pode possuir uma coloração castanho-avermelhado, acastanhada, castanho-acinzentado ou verde-oliva (Figura 11) (AlgaeBase). Na fase laminar, fixam-se ao substrato por células rizóides (Graham *et al.*, 2008). A lâmina possui uma forma orbiculada alongada, podendo ser simples ou

múltipla, por vezes formando uma roseta. A base da lâmina é cordada e ao se sobrepor parece umbilical. Por vezes, as margens da lâmina são bastante plissadas (AlgaeBase).



Figura 10 - *Porphyra umbilicalis* (Kützinger, 1843) (fonte: <http://www.algaebase.org/>).

A fase laminar da *Porphyra dioica* é caracterizada por possuir uma coloração entre o verde-oliva e o roxo-acastanhado, e forma lanceolada (Figura 10). É uma espécie dióica, que, durante a sua fase de reprodução, é possível observar nas extremidades da lâmina as estruturas com os esporângios, *sori*. Sendo que, nos machos a extremidade da lâmina adquire uma tonalidade amarelada e nas fêmeas uma tonalidade avermelhada (Brodie & Irvine 1997).

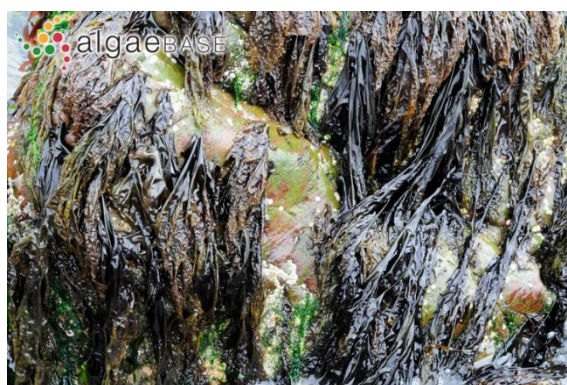


Figura 11 - *Porphyra dioica* (J.Brodie & L.M.Irvine, 1997) (fonte: <http://www.algaebase.org/>).

Segundo Brodie & Irvine (1997), não é conhecida a distribuição exata da espécie *Porphyra dioica*, no entanto, considera-se que se encontra no Nordeste do Atlântico. Encontra-se sobretudo na zona intertidal de praias rochosas, ao longo de todo o ano. Possui a capacidade de sobreviver numa ampla gama de temperatura, de fotoperíodo e de intensidade luminosa. Apresenta maiores densidades no fim do inverno e durante os meses de primavera (Pereira *et al.*, 2004). A *Porphyra dioica* é a espécie mais comum do género *Porphyra* em Portugal (Pereira *et al.*, 2006).

Porphyra umbilicalis encontra-se distribuída pelo Atlântico Norte, sobretudo fixa em rochas e mexilhões, na zona entre marés de costas expostas (AlgaeBase).

Os espermatângios são os gâmetas masculinos, e são produzidos numa estrutura na margem da lâmina, quando se verifica que esta se começa a degradar, é quando ocorre a libertação dos gâmetas. Os carpogónios são os gâmetas femininos, e são formados na margem da lâmina, no lado inverso e, possuem um recetor na

superfície, o tricógino. Este recetor irá permitir que o gâmeta masculino fertilize o carpogónio (Braune & Guiry, 2011).

Após a fertilização, o zigoto resultante começa a dividir-se em grupos (carposporângio) de carpósporos diplóides (zigotósporos, 2n) (Pereira & Yarish, 2008). Após a libertação dos esporos, os zigotósporos germinam de forma unipolar, para darem início à fase filamentosa de *conchocelis* (diplóides, 2n). Os *conchocelis* possuem a capacidade de sobreviver em condições ambientais adversas, sendo que quando se encontram em condições favoráveis, originam ramificações de maior diâmetro, os *conchosporangia* cujas células, mediante determinadas condições, se irão diferenciar em *conchosporos*. Os *conchosporos* irão germinar de forma bipolar, dando origem a talos quiméricos, completando assim o ciclo de vida (Baweja *et al.*, 2016).

Reprodução assexuada:

Na reprodução assexuada, as lâminas de *Porphyra* libertam esporos unicelulares e imóveis, na coluna de água. A libertação dos esporos ocorre através do mecanismo de produção e inchaço da mucilagem. Em condições favoráveis, esporos irão fixar-se a um substrato e desenvolver-se-ão a partir de sucessivas mitoses, dando origem a um novo talo, similar ao que lhe deu origem (Graham *et al.*, 2008). A reprodução assexuada ocorre apenas em algumas espécies (por exemplo, *Porphyra yezoensis*) (Pereira & Yarish, 2008).

1.13.1 Potenciais aplicações e interesse económico

As espécies do género *Porphyra*, são das algas marinhas cultivadas com maior importância económica. Apresentam um crescimento constante na sua produção a nível mundial, ocupando o sexto lugar na tabela das algas mais cultivadas. Em 2016 foram cultivadas 1,35 milhões de toneladas frescas (FAO, 2018b).

Estas algas marinhas, têm vindo a ser cultivadas nos últimos 100 anos, no Japão. Atualmente, apresenta ser uma das maiores indústrias na maricultura na China, no Japão e na Coreia (Baweja *et al.*, 2016), onde são cultivadas de forma extensiva, e bastante utilizadas no consumo humano porque são utilizadas, por exemplo, no *sushi* (Silva *et al.*, 2015).

Estas algas vermelhas são ricas em ferro, zinco, sódio, potássio e cálcio (Dawczynski *et al.*, 2007). Devido ao seu valor nutricional e ao seu perfil de compostos bioativos, as espécies de *Porphyra* podem ser utilizadas em alimentos funcionais, medicamentos e biofertilizantes (Hong *et al.*, 2007). Além disso, os polissacarídeos

extraídos destas espécies possuem atividades anticoagulantes, antitumorais e estimulam o sistema imunológico (Zhang *et al.*, 2003).

Devido à elevada relação superfície/volume, estas algas vermelhas possuem um rápido crescimento e, são capazes de assimilar os nutrientes (azoto e fósforo) de forma rápida (Neori *et al.*, 2004). Estas características sugerem que, estas algas, são boas candidatas para serem utilizadas em biorremediação e serem introduzidas em sistemas IMTA (Silva *et al.*, 2015).

1.14 *Ulva rigida* (C. Agardh, 1823)

Tabela 8 – Classificação taxonómica de *Ulva rigida* (fonte: <http://www.algaebase.org/>).

Reino	Plantae
Filo	Chlorophyta
Classe	Chlorophytina
Ordem	Ulvales
Família	Ulvaceae
Género	<i>Ulva</i>
Espécie	<i>Ulva rigida</i> (C. Agardh 1823)

Ulva rigida é uma alga marinha verde. As espécies do género *Ulva* são vulgarmente conhecidas como a “alface do mar” devido à sua morfologia idêntica à da típica alface (Figura 13). As lâminas possuem uma forma achatada e o seu tamanho varia entre os 30 e os 50 cm, contudo, podem alcançar 1 metro de comprimento (Graham *et al.*, 2008). São organismos distromáticos, ou seja, são constituídos por apenas 2 camadas de células, e cada célula possui um cloroplasto em forma de copo (Baweja *et al.*, 2016).



Figura 13 - *Ulva rigida* (C. Agardh, 1823) (fonte: <http://www.algaebase.org/>).

Estas algas marinhas encontram-se fixas ao substrato através de rizóides e, também ocorrem em livre flutuação (Graham *et al.*, 2008).

É possível diferenciar, a nível morfológico, os indivíduos mais jovens dos mais velhos. Os indivíduos mais jovens apresentam uma coloração verde escura e possuem um toque macio, em contrapartida, os indivíduos mais velhos apresentam uma coloração verde clara e a sua superfície torna-se mais viscosa (Baweja *et al.*, 2016).

As espécies de *Ulva* são encontradas em diversos *habitats* e fixas em diferentes substratos, tais como rochas na zona intertidal (Silva *et al.*, 2015; Graham *et al.*, 2008). A *Ulva rigida* ocorre, preferencialmente, em ambientes eutrofizados, tais como, zonas lagunares ricas em fosfatos, amónia e fitoplâncton (AlgaeBase).

O ciclo de vida da *Ulva rigida* é bifásico, ou seja, consiste na alternância entre duas gerações, de esporófito (diplóide, $2n$) e de gametófito (haplóide, n). O ciclo de vida deste género é isomórfico, ou seja, tanto a fase de esporófito como a fase de gametófito são morfológicamente semelhantes e não são possíveis de distinguir a olho nu (Figura 14) (Graham *et al.*, 2008).

Sob condições indutoras, células específicas dos gametófitos masculinos e

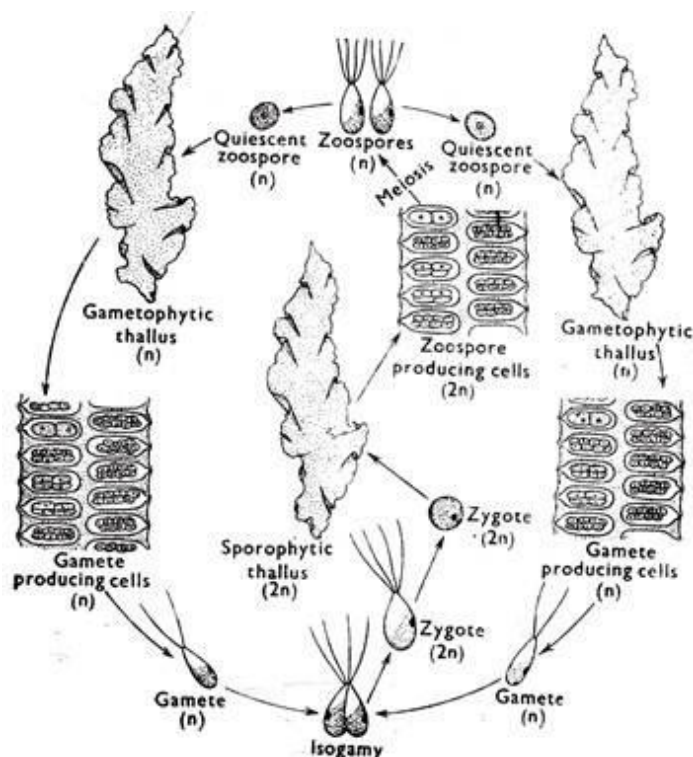


Figura 14 - Ciclo de vida do género *Ulva* mostrando diferentes estágios de desenvolvimento (fonte: <http://www.biologydiscussion.com/algae/classification-of-ulvae-algae/57951>).

femininos, através de mitoses, produzem gametas haplóides (n) e biflagelados, que se

irão conjugar e originar um zigoto diplóide ($2n$). Esta reprodução sexuada é do tipo anisogamia, ou seja, o gâmeta masculino é mais pequeno e possui maior mobilidade do que o gâmeta feminino (Graham *et al.*, 2008).

O zigoto diplóide ($2n$) sofre divisões mitóticas sucessivas até formar o esporófito multicelular diplóide ($2n$), morfologicamente idêntico aos gametófitos (Graham *et al.*, 2008).

Sob condições indutoras, algumas células do esporófito sofrem divisões meióticas, dando origem a zoósporos (esporos haplóides, n) quadriflagelados. Cada esporo, ao germinar, origina um gametófito masculino ou feminino, completando assim, o ciclo de vida (Graham *et al.*, 2008).

Os zoósporos flagelados e os gâmetas são produzidos em elevadas quantidades, durante a reprodução assexuada e sexuada, respetivamente. Além disso, são produzidos no bordo do talo evitando que ocorra a desintegração dos reprodutores (Graham *et al.*, 2008).

1.14.1 Potenciais aplicações e interesse económico

No leste Asiático, é bastante comum o uso de algas do género *Ulva*, e de outras algas marinhas, na alimentação, e esta tendência está a expandir-se, de forma gradual, para o resto do mundo (Christiansen, 2017). Aliás, são o género de algas verdes comestíveis mais comuns no consumo humano (Bocanegra *et al.*, 2009), sendo descritas como uma potencial fonte de proteínas na nutrição humana (Fleurence *et al.*, 1995).

Estas algas marinhas possuem, na sua composição, uma quantidade significativa de polissacarídeos, que varia entre 15 e 65% do total da matéria seca (Kraan, 2013). Estes polissacarídeos incluem ulvanos, polissacarídeos sulfatados, ácido urónico e xilose como componentes principais, mas também glucanos incluindo amido (Bikker *et al.*, 2016). Os polissacarídeos sulfatados têm sido reportados como tendo uma função antiviral e gelificante. Além disso, apresentam um elevado teor de proteína bruta (Cruz-Suárez *et al.*, 2009), possuem um bom perfil de vitamínicos e minerais e são especialmente ricas em ácido ascórbico (Ergün *et al.*, 2009). O seu principal carotenoide é a luteína (Cruz-Suárez *et al.*, 2009).

Uma vez que estas algas marinhas são facilmente cultivadas (Cruz-Suárez *et al.*, 2009), nos últimos anos, têm vindo a ser investigadas como possíveis ingredientes nas dietas de uma ampla variedade de espécies de peixes. Estudos realizados demonstraram que a incorporação de farinha de *Ulva*, em baixos níveis, tem resultado

em melhorias tanto no crescimento dos indivíduos, como na utilização da ração, na atividade fisiológica, na resistência a doenças e na qualidade da carcaça dos animais (Wassef *et al.*, 2005; Valente *et al.*, 2006; Ergün *et al.*, 2009).

A Vitamina C promove o metabolismo lipídico, como tal, poderá alterar a composição corporal do peixe, influenciando a deposição de nutrientes, reduzindo o conteúdo lipídico da carcaça da espécie consumidora e aumentando os níveis de proteína (Ergün *et al.*, 2009).

Espécies do género *Ulva* têm vindo a ser cultivadas, com sucesso, em sistemas IMTA, permitindo condições de cultivo controladas. Além disso, têm sido bastante utilizadas como biofiltros, na remoção dos nutrientes em excesso (azoto e fósforo), nas águas residuais das aquaculturas (Bikker *et al.*, 2016). Isto porque, estas algas marinhas possuem uma elevada eficiência na remoção de compostos inorgânicos azotados (até 90% na forma de amónia), de efluentes piscícolas. Possuem uma capacidade de utilizar, rápida absorção e metabolizam diferentes formas de azoto inorgânico, principalmente nitrato e amónia, consoante a sua disponibilidade (Pinchetti *et al.*, 1998).

1.15 Empresa ALGAplus

A empresa ALGAplus surgiu com o objetivo de produzir macroalgas e produtos derivados, de uma forma ecologicamente sustentável e socialmente responsável, promovendo a implementação de Sistemas de Aquacultura Multi-trófica Integrada. Todo o processo de produção é realizado num ambiente controlado e com certificação biológica. Possui uma marca de produtos alimentares, *Tok de Mar*, e, uma marca de produtos de bem-estar, *SeaOriginals*. Além disso, a ALGAplus fornece biomassas para vários projetos de investigação.

As espécies comercializadas são: *Chondrus crispus*, *Codium tomentosum*, *Fucus vesiculosus*, *Gracilaria* sp., *Palmaria palmata*, *Porphyra dioica*, *Porphyra umbilicalis* e *Ulva rigida*.

A empresa reúne dois departamentos principais: Departamento de Produção e o Departamento de Investigação, Desenvolvimento e Inovação (IDI).

1.15.1 Departamento de Produção

O departamento de Produção é composto por diferentes etapas: colheita, lavagem, processamento, embalagem e armazenamento, sendo que, cada uma destas fases é executada em diferentes áreas.

A colheita das algas é realizada na área exterior, nos tanques de produção, nos esteiros ou nos canais de água. Para se proceder à colheita nos tanques de produção, é necessário baixar o seu nível da água. A colheita é realizada de forma manual, para caixas de plástico, com recurso ao uso de redes de pesca. Após a colheita, os tanques são lavados com água e lixívia, com o objetivo de remover quaisquer organismos que possam estar nas paredes dos tanques, como *Thoracica*, *Mytilus* sp. ou algas verdes. Após se verificar que não existem quaisquer resíduos de lixívia, os tanques estão prontos para serem repovoados novamente. O repovoamento pode ser feito, ou com a mesma cultura, que foi colhida apenas para se proceder à sua pesagem e acompanhar o crescimento, ou, então, quando se inicia uma cultura nova, a biomassa é colhida dos esteiros ou dos canais de água presentes na empresa, onde as espécies ocorrem naturalmente (no caso da *Gracilaria* sp., *Fucus vesiculosus* e *Ulva rigida*). Nesta situação, antes de se proceder à repovoação dos tanques, a alga é lavada e pesada.

Após a colheita, a biomassa é transportada para a sala de produção, onde se irão efetuar as fases de lavagem e processamento. A *Ulva rigida* é lavada, com água salgada, numa máquina adequada para o efeito. As restantes espécies são lavadas de forma manual. De seguida é centrifugada, para que a água em excesso seja removida, e depois é pesada.

A alga pode ser vendida seca ou fresca. A alga que é vendida seca tem que sofrer um processo de secagem (desidratada a 25°C durante 48h) e depois, pode ser imediatamente embalada, ou, pode ser colocada na máquina de moagem e, para que seja possível separar os diferentes tamanhos dos flocos de alga, é utilizado um crivo com a malha da rede adequada para o pretendido. O processo de secagem consiste na desidratação das algas a 25°C, durante 48h, com o objetivo que atinjam entre 10 a 12% de humidade, desta forma, minimiza-se a atividade enzimática, permitindo a conservação das propriedades dos compostos bioativos. A alga que é vendida fresca, após ser pesada, é-lhe adicionada sal e embalada.

O embalamento é realizado numa sala auxiliar à produção, e o armazenamento pode ser feito numa câmara frigorífica ou no armazém (consoante o produto em questão).

1.15.2 Departamento de Investigação, Desenvolvimento e Inovação (IDI)

O IDI inclui uma zona interior, a maternidade, composta pelo laboratório, que possui duas câmaras de cultivo, e uma zona exterior, com tanques que variam desde 15L, 127L, 230L, 500L a 1000L.

Na maternidade é onde se mantêm os *stocks* das culturas e onde são iniciados ciclos de vida de determinadas espécies de macroalgas. O trabalho neste local é realizado em condições de assépsia devido à vulnerabilidade e à suscetibilidade das culturas. Quando a alga se encontra apta para ser transferida para o exterior é aclimatada nos tanques do IDI. Este departamento dedica-se à execução de projetos bem como, à manutenção das variedades em coleção. Além disso, mantêm uma investigação constante para otimizar as condições de cultivo das espécies existentes e controlo da qualidade das mesmas.

Neste departamento, para além de se otimizarem as condições de cultivo são também efetuados testes de cultivo de novas espécies. O estado da alga é observado diariamente e, todas as semanas procede-se à pesagem da biomassa de todos os tanques para que as densidades sejam ajustadas, e, se necessário, transferir para um tanque de volume superior. Uma vez nos tanques do IDI, a alga pode ser transferida para os tanques da produção, ou então, ir diretamente para a fase de lavagem e processamento.

Todos os dias é necessário realizar rotinas diárias com o objetivo de assegurar que não ocorreram perdas de biomassa e que a alga esteja com um arejamento adequado. Como tal, é realizada uma verificação a todos os tanques, e, de seguida, realiza-se uma purga a todas as torneiras e procede-se à troca dos filtros de água. O arejamento é ajustado e o fluxo de água é acertado. Os filtros da água filtrada do laboratório são lavados todos os dias. A salinidade, o pH e a temperatura são medidos diariamente. Estas rotinas diárias são realizadas tanto nos tanques da produção como nos tanques do IDI.

1.16 Objetivos

(1) Numa primeira fase, adquirir conhecimentos no processo de produção de macroalgas cultivadas segundo o conceito IMTA na empresa ALGAplus, bem como, todas as rotinas e procedimentos realizados no IDI;

(2) A segunda fase foi realizada no departamento de Biologia da Faculdade de Ciências do Porto e destinou-se a utilizar extratos de 3 espécies de algas (*Fucus*

vesiculosus, *Nannochloropsis gaditana* e *Ulva rigida*) em dietas experimentais para realizar um ensaio com peixe-zebra (*Danio rerio*) de forma a verificar se produzem algum efeito no crescimento dos peixes e a averiguar qual o melhor extrato a ser incluído em dietas para peixes produzidos em aquacultura, num ensaio posterior, nomeadamente, para corvina (*Argyrosomus regius*).

2. Metodologia

Ao longo do meu estágio curricular, na empresa ALGAplus, tive a possibilidade de integrar diversas tarefas, tanto no IDI como no Departamento de Produção.

O Departamento IDI é composto pela maternidade e por uma zona exterior, a Produção 1. A maternidade é constituída pelo laboratório e por duas câmaras de frio, *short-day* (SD) de 8:16 horas de luz-escuridão e *long-day* (LD) de 16:8 horas de luz-escuridão. A Produção 1, possui tanques de polietileno com capacidade que varia desde 15L, 127L, 230L, 500L a 1000L. Além disso, é responsável pelo acompanhamento e monitorização da biomassa presente em tanques de tela de 7 500L e tanques de cimento de 15 000L.

O Departamento de Produção é composto, por uma zona exterior, a Produção 2, com tanques de cimento que variam desde 15 000L a 20 000L, e, por uma zona interior, constituída pela sala de produção, armazém e câmara frigorífica.

Tanto os tanques de Produção 1 como os tanques de Produção 2 possuem arejamento que provém da parte inferior do tanque, na zona central. Deste modo, a alga circula de forma contínua, ou seja, a biomassa ascende pelo centro do tanque até à superfície, dirige-se para as paredes do mesmo e desce na coluna de água para retornar a ascender pelo centro (Figura 15). Havendo uma boa circulação da alga no tanque, todos os indivíduos passam pela superfície de forma a captarem luz, ficando expostos a uma maior disponibilização de nutrientes.

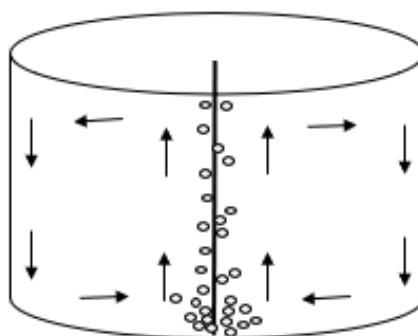


Figura 15 - Esquema do movimento da alga com arejamento central, na parte inferior dos tanques.

O NAVIA é um *software* no qual todas as tarefas realizadas, quer no IDI, quer no Departamento de Produção, são introduzidas. Desta forma, todos os dados de cultivo e produção estão inseridos nesta base de dados, permitindo rápido acesso no momento da sua análise. Além disso, como é possível anotar anomalias observadas, caso se observe uma quebra de produção, é possível chegar rapidamente à sua origem. Este

software permite ainda agendar tarefas (dia e hora), de forma que, ao se realizar *login* é possível visualizar quais as tarefas que estão destinadas a ser realizadas nesse mesmo dia.

O sistema de produção utilizado na empresa ALGAplus baseia-se no cultivo de macroalgas, num sistema IMTA desenvolvido em terra, que inclui (para além dos tanques de polietileno, de cimento e de tela) uma área total de 14ha de esteiros, nos quais a água é renovada pelos ciclos de maré da Ria de Aveiro. Nesses esteiros há produção de peixes (robalos e douradas) e de macroalgas, que aí ocorrem de forma natural. Todos os tanques, presentes no sistema, são abastecidos por água, bombeada de dois esteiros povoados por peixes. Antes de se fornecer a água captada aos tanques, esta sofre um processo de filtração, passando por um rotofiltro de 50 μm e, de seguida, por um filtro de areia. Em consequência, a água que é fornecida aos tanques povoados com as macroalgas em cultivo, encontra-se rica em nutrientes resultantes das excreções dos peixes. As algas assimilam estes nutrientes em excesso e produzem biomassa potencialmente útil, contribuindo para a sustentabilidade ambiental e económica da empresa.

O processo de produção de biomassa inicia-se no laboratório. Neste local, ocorre a indução da reprodução de algumas espécies de macroalgas, nomeadamente, *Porphyra dioica* e *Porphyra umbilicalis*, permitindo a manipulação de diferentes fases do seu ciclo de vida. Além disso, é realizada uma monitorização e manutenção das culturas em cultivo. Após a fase de *conchocelis*, é possível observar o aparecimento de lâminas em matrizes/frascos de vidro. Contudo, as lâminas encontram-se fixas nas paredes pois necessitam de substrato para germinar. Por isso, é necessário proceder à raspagem das lâminas para que estas sejam transferidas para garrações de 10L, e fiquem em *free-floating*. A partir desta fase, as lâminas vão sendo transferidas, semanalmente, para volumes superiores, uma vez que, a sua biomassa vai aumentando e necessitam de mais espaço disponível, para que o seu crescimento não seja inibido. Como tal, o esquema de transferências das lâminas, no laboratório, consiste em matrizes/frascos – garrações de 10L – garrações de 20L. Ao longo do período em que as lâminas se mantêm em cultivo na maternidade, procede-se ao fornecimento de nutrientes com um Meio Biológico (pulsos), que potencia o rápido crescimento das algas. Quando se verifica que as lâminas se encontram aptas para serem cultivadas no exterior, procede-se à sua transferência para os tanques do IDI.

No exterior, as algas são aclimatadas nos tanques de menor capacidade. Semanalmente, é realizada uma pesagem da biomassa, com o intuito de ajustar a sua

densidade, nos respetivos tanques. A alga é transferida para tanques de volume superior quando se obtiver biomassa suficiente, que respeite a densidade pretendida para o volume do tanque em questão. Eventualmente, as espécies em cultivo, alcançam os tanques de tela e de cimento, de maior capacidade (7 500 e 15 000L, respetivamente).

Numa fase final, a alga é colhida dos tanques e transportada para a sala da produção, onde se procede ao seu processamento passando por etapas como a lavagem, secagem, moagem e embalamento. Consoante o produto final pretendido, procede-se à salga (fresca), ou, à secagem e moagem (seca). No final, a alga é embalada.

A produção de *Ulva rigida*, *Fucus vesiculosus* e *Gracilariaria* sp., não se inicia na maternidade, uma vez que, estas espécies de macroalgas, ocorrem de forma natural nos esteiros e nos canais presentes da empresa. Como tal, são colhidas de populações selvagens estabelecidas e povoam-se os tanques de cimento com a biomassa na densidade pretendida. Antes de se proceder ao povoamento, a alga é previamente lavada e pesada. A lavagem é efetuada com água doce, com o objetivo de remover lama, outras algas e/ou organismos que possam vir anexados.

2.1 Preparação, lavagem e armazenamento do material

Para que não ocorra contaminação das culturas de macroalgas em cultivo no laboratório, é necessário utilizar material autoclavado durante a sua manutenção e manuseamento. Como tal, a preparação e lavagem prévia do material é um passo fundamental para as tarefas realizadas no laboratório.

O processo de autoclavagem consiste em submeter o material contaminado a calor húmido, na forma de vapor saturado, sob pressão, durante um período de tempo suficiente para esterilizar todo o material. O calor húmido conduz à desnaturação das proteínas e destabilização da membrana citoplasmática das células microbianas, provocando assim a sua morte.

Por norma, o autoclave do laboratório funciona sob a pressão de 1 atm (acima da pressão atmosférica) e à temperatura de 121°C.

1 – Na zona de lavagem, todo o material utilizado é colocado num tabuleiro com água e hipoclorito. No caso dos balões de vidro e matrizes, são enchidos com água e hipoclorito no seu interior.

2 – Procede-se à lavagem do material com detergente neutro, utilizando esponja ou escovilhões, de forma a retirar restos de cultura, microrganismos que possam estar nas paredes dos materiais e toda a sujidade.

3 – Todo o material é passado por água até que todos os vestígios de hipoclorito sejam eliminados.

4 – O material é colocado a secar no escurridor.

5 – Assim que o material se encontra seco, procede-se à sua preparação para ser autoclavado. Todas as superfícies que se encontram em contacto com o ar são cobertas com papel alumínio. Como por exemplo, o gargalo de matrizes e de gobelés. Pipetas, caixas de *petri* e vidros de relógio são completamente revestidos por papel de alumínio. No caso das garrafas de vidro, a rolha não pode ficar completamente enroscada de forma a que haja saída de ar quente e entrada de vapor, caso contrário, poderá rebentar durante a sua esterilização. Nos materiais utilizados para fases de manuseamento mais sensíveis, nomeadamente, *carboys* (recipientes rígidos, com formato de garrafão e capacidade de 20L para armazenar líquidos) com água filtrada e kit de filtração, coloca-se uma fita indicadora de autoclaveagem.

6 – O material preparado é armazenado num local definido, até ser colocado a autoclavar.

7 – O material é colocado a autoclavar em ciclos de 1 hora, a 1 atm e a 121°C. No fim do ciclo, após a temperatura baixar no autoclave, retira-se todo o material esterilizado e procede-se ao seu armazenamento, no seu respetivo local, com o auxílio de luvas.

2.2 Lavagem e preparação dos *carboys* com água salgada autoclavada e filtrada

Os *carboys*, são recipientes rígidos, com formato de garrafão e capacidade de 20L, utilizados no laboratório para armazenar água salgada autoclavada e filtrada (ASW).

A ASW é utilizada em fases do ciclo de vida mais sensíveis da *Porphyra dioica* e *Porphyra umbilicalis*. Nomeadamente, para balões com *conchocelis* e em matrizes de frascos de 4L que possuam as primeiras lâminas de *Porphyra dioica* e *Porphyra umbilicalis*. Também é utilizado em algumas culturas de outras macroalgas, como o caso do *Codium tomentosum*. A ASW, sendo esterilizada, é essencial para a cultura das macroalgas, uma vez que, todos os microrganismos que pudesse conter são eliminados

durante o processo de autoclavagem. Desta forma, as culturas não são contaminadas por outros organismos, não tendo por isso, que competir por nutrientes disponíveis.

O ciclo de autoclavagem para ASW é mais demorado uma vez que se pretende assegurar que todos os microrganismos sejam eliminados e porque o volume a esterilizar é superior do que quando se autoclava apenas material.

- 1 – Os *carboys* utilizados são lavados com detergente neutro.
- 2 – De seguida, procede-se à sua lavagem com água doce até que todos os vestígios de detergente neutro sejam eliminados.
- 3 – Coloca-se uma fita indicadora de autoclavagem do material.
- 4 – Enche-se o *carboy* com água salgada filtrada, até ao volume pretendido. Coloca-se a tampa, mas não se enrosca completamente.
- 5 – Coloca-se o *carboy* a autoclavar em ciclos de 2 horas, a 1 atm e a 121°C. No final, após a temperatura baixar no autoclave, coloca-se o *carboy* na câmara de frio *short-day*, de forma a arrefecer antes de ser utilizado.

2.3 Lavagem e preparação dos garrafões de 10L e dos garrafões de 20L

No laboratório, são utilizados garrafões com capacidade de 10L e garrafões com capacidade de 20L. Por norma, nas culturas de *Porphyra umbilicalis* e *Porphyra dioica*, as lâminas são transferidas de matrizes de 1 L e/ou de frascos de 4L, para garrafões de 10L. Quando necessário, de forma a ajustar a densidade e a fornecer mais espaço às lâminas para crescerem, as lâminas são transferidas para garrafões de 20L.

Para certos procedimentos, como por exemplo, transferências de garrafões para outros garrafões, ou, para quando se efetuam raspagens, é necessário realizar-se uma lavagem cuidada dos garrafões a serem utilizados, para que não ocorram contaminações dos lotes em cultivo. Como tal, é realizada uma desinfeção dos garrafões, para que todos os microrganismos, sujidade e restos de lâminas, que pudessem ter ficado da última utilização, sejam eliminados.

Este procedimento é essencial, uma vez que, as lâminas, numa fase inicial, ainda apresentam um tamanho consideravelmente pequeno, e, caso coexistam outros organismos, terão que competir por nutrientes o que poderá comprometer o seu crescimento. Além disso, se o objetivo é produzir uma determinada espécie e cultivá-la no exterior, caso não haja este cuidado na preparação e lavagem dos garrafões,

poderão desenvolver-se outros organismos, dificultando a produção das macroalgas e implicando a realização de um processo de escolha e seleção.

1 – Com auxílio de um esguicho, cobrem-se as paredes e fundo do garrafão com hipoclorito. Deixa-se o hipoclorito a atuar.

2 – De forma a retirar lâminas que possam estar fixas do lote anterior, ou, até mesmo, outros organismos, utiliza-se um esfregão com detergente neutro, para raspar as paredes do garrafão.

3 – Lava-se bem com água até se verificar que não existam vestígios de hipoclorito.

4 – Enche-se o garrafão com água salgada filtrada (FSW) até ao nível pretendido.

2.4 Pulsos – adição de meio às culturas

Após a indução da reprodução das espécies de *Porphyra* em cultivo, os conchosporos germinam dando origem a lâminas. Todas as semanas, é realizado um acompanhamento, a todos os matrizes de 1L e frascos de 4L, nos quais já se observa a presença de lâminas.

Os pulsos são realizados com o objetivo de adicionar Meio Biológico, ou seja, fornecer nutrientes às culturas de algas. Isto porque, a renovação de água é realizada apenas quando se procede à mudança de meio (descrita no ponto 2.5), por vezes de duas em duas semanas. Como tal, é necessário adicionar nutrientes ao meio.

Por norma, este procedimento é realizado à sexta-feira.

1 – Conforme o plano semanal, retiram-se da câmara de cultura os frascos de 4L e os matrizes de 1L, destinados aos pulsos e são transportados até à zona de trabalho no laboratório.

2 – Adiciona-se Meio Biológico aos frascos e aos matrizes com as culturas de algas. De seguida, orienta-se a vareta de vidro para a frente. Tapa-se o gargalo do frasco/matraz com parafilme. Coloca-se um tubo de arejamento, previamente autoclavado, na ponta da vareta.

3 – Repete-se este procedimento para todos os frasco e/ou matrizes que estejam destinados a pulso.

4 – Transportam-se os frascos/matrazes para a câmara de cultura. Monta-se o sistema de arejamento, colocando os tubos nas torneiras de saída de ar. Ajustam-se os arejamentos.

2.5 Mudanças de meio

Consoante o tempo que tenha decorrido desde a última mudança de meio, são selecionados os lotes aos quais é necessário realizar este procedimento. Além disso, também é efetuada uma observação à presença de *conchocelis* nos diferentes lotes. Em situações em que as culturas apresentam uma quantidade considerável destas estruturas reprodutivas, procede-se à realização de mudança de meio, com o objetivo de as remover. Isto porque, estando presentes, competem com as lâminas por nutrientes podendo comprometer o seu crescimento.

Por norma, este procedimento é realizado à sexta-feira.

1 – Conforme o plano semanal, retiram-se da câmara de cultura os frascos de 4L e os matrizes de 1L, destinados às mudanças de meio e são transportados até à zona de trabalho no laboratório.

2 – Todo o material a ser utilizado é desinfetado com álcool etílico a 70%, nomeadamente, raspadores e varetas de vidro. De seguida, lava-se com água de forma a que sejam eliminados quaisquer vestígios do álcool etílico.

3 – Com o auxílio de um raspador, retiram-se os *conchocelis* das paredes do frasco/matraz e da vareta. Este procedimento realiza-se de forma delicada, de maneira a que não se removam as lâminas que possam estar fixas e estabelecidas na zona envolvente aos *conchocelis*. De seguida, rejeita-se a água do frasco/matraz para o lavatório. Assim, obtemos apenas as lâminas.

4 – Enche-se novamente o frasco com 4L de ASW. No caso dos matrizes, com 1L de ASW.

5 – Adiciona-se Meio Biológico e devolve-se o material à câmara de cultura destinada.

6 – Repete-se este procedimento para todos os frasco e/ou matrizes que estejam destinados a mudança de meio.

7 – Transportam-se frascos/matrazes para a câmara de cultura. Monta-se o sistema de arejamento, colocando os tubos nas torneiras de saída de ar. Ajustam-se os arejamentos.

2.6 Raspagens de *Porphyra dioica* e *Porphyra umbilicalis*

Uma vez que as lâminas se encontram fixas, nas paredes e no fundo, dos matrizes e dos frascos, é necessário proceder à raspagem das mesmas. Quando se verifica que as lâminas possuem um tamanho razoável, é realizada a sua raspagem e são transferidas para garrações de 10L. Desta forma, terão mais espaço para crescer. Além disso, deixam de estar fixas e passam a circular livremente, no sentido *bottom-up*. Estando em movimento contínuo, todas as lâminas são capazes de captar luz e realizar a fotossíntese.

Por norma, os matrizes e frascos a serem raspados, são os que se encontram há mais tempo em cultivo.

Este procedimento é realizado todas as semanas, à quinta-feira.

1 – Conforme o plano semanal, retiram-se da câmara de cultura os frascos de 4L e os matrizes de 1L, destinados às raspagens e são transportados até à zona de trabalho no laboratório.

2 – Observa-se a quantidade, o tamanho e a coloração das lâminas e procede-se ao seu registo no NAVIA. Esta informação é importante, para que se mantenha um registo da qualidade da alga ao longo do seu cultivo.

3 – Todo o material a ser utilizado é desinfetado com álcool etílico a 70%, nomeadamente, um frasco de vidro, raspadores e varetas de vidro. De seguida, lava-se com água de forma a que desapareçam quaisquer vestígios do álcool etílico.

4 – Com o auxílio de um raspador, raspam-se as lâminas da vareta até que estas fiquem soltas. Com um esguicho com FSW, orientam-se as lâminas para o fundo do frasco. De seguida, procede-se à raspagem de todas as lâminas que se encontram nas paredes e no fundo do frasco. Com um esguicho com água FSW, orienta-se as lâminas para o fundo do frasco.

5 – Vira-se a FSW com as lâminas para o garrafão de 10L destinado, previamente lavado e preparado. De forma a facilitar este procedimento, enche-se o frasco ou matrizes até meio com FSW.

6 – Enche-se o garrafão com FSW até ao limite dos 10L.

7 – Adiciona-se Meio Biológico e devolve-se o material à câmara de cultura destinada.

2.7 Transferências de garrações de 10L para garrações de 20L

As transferências de garrações de 10L para garrações de 20L são realizadas tanto para a *Porphyra dioica* como para a *Porphyra umbilicalis*.

Este procedimento é realizado todas as quartas-feiras, por norma.

1 – Conforme o plano semanal, retiram-se da câmara de cultivo, os garrações com capacidade de 10L destinados às transferências para os garrações com capacidade de 20L e, são transportados até à zona de trabalho no laboratório.

2 – Observa-se a quantidade, o tamanho e a coloração das lâminas e procede-se ao seu registo no NAVIA.

3 – Todo o material a ser utilizado é desinfetado com álcool etílico a 70%. De seguida, lava-se com água de forma a que sejam eliminados quaisquer vestígios do álcool etílico.

4 – Vira-se o garrafão para o filtro, de forma a rejeitar a água e a que as lâminas fiquem aglomeradas no filtro.

5 – Com o copo, previamente autoclavado, espremem-se as lâminas contra o filtro, de forma a que todo o excesso de água seja removido, para que se proceda à sua pesagem.

6 – Numa balança analítica, tara-se um copo.

7 – Com o auxílio de uma colher, as lâminas são transferidas do filtro para o copo previamente tarado. Procede-se à pesagem da biomassa na balança analítica e regista-se o valor obtido.

8 – Repete-se este procedimento para todos os garrações de 10L, definidos no plano semanal.

9 – Enchem-se os garrações de 20L com ASW, previamente lavados, e, repovoam-se com as lâminas que se encontram já divididas, em diferentes frascos.

10 – Adiciona-se Meio Biológico aos garrações de 20L e devolve-se o material à câmara de cultivo definida.

2.8 Transferências de garrações de 20L de *Porphyra dioica* e de *Porphyra umbilicalis* para o exterior

Semanalmente, são realizadas as transferências para o exterior das lâminas, de *Porphyra dioica* e de *Porphyra umbilicalis* que se encontram nos garrações de 20L. Isto

porque, nesta fase de cultivo, já se encontram com um tamanho favorável a serem transferidas para tanques de 127L (no caso da *Porphyra dioica*) e 230L (no caso da *Porphyra umbilicalis*).

A *Porphyra umbilicalis*, como é mantida durante um período de tempo superior na maternidade, pode ser transferida diretamente para tanques de maior capacidade, até porque a quantidade da sua biomassa em cultivo, é superior.

Por norma, as transferências para o exterior são realizadas à terça-feira.

1 – Conforme o plano semanal, retiram-se das câmaras de cultura os garrafões destinados às transferências para o exterior e, são transportados até à zona de trabalho no laboratório.

2 – Observa-se a quantidade, o tamanho e a coloração das lâminas e procede-se ao seu registo no NAVIA.

3 – Todo o material a ser utilizado é desinfetado com álcool etílico a 70%. De seguida, lava-se com água de forma a que sejam eliminados quaisquer vestígios de álcool etílico.

4 – Vira-se o garrafão para o filtro, de forma a rejeitar a água e a que as lâminas fiquem aglomeradas no filtro.

5 – Com o copo, previamente autoclavado, espremem-se as lâminas contra o filtro, de forma a que todo o excesso de água seja removido, para que se proceda à sua pesagem.

6 – Numa balança analítica, tara-se uma folha de papel alumínio com formato de caixa.

7 – Com o auxílio de uma colher, transferem-se as lâminas do filtro para a folha de alumínio, procedendo-se à pesagem da biomassa na balança analítica. Regista-se o valor obtido. Coloca-se a biomassa pesada num tabuleiro de plástico.

8 – Repete-se este procedimento para todos os garrafões que estejam destinados a ser transferidos para o exterior, como definido no plano semanal.

9 – Calcula-se o somatório de todos os pesos obtidos dos garrafões de *Porphyra dioica* e, tendo em consideração a densidade que se pretende obter nos tanques, calcula-se a quantidade de biomassa que irá para cada tanque exterior. Procede-se à divisão da biomassa que se encontra no tabuleiro e coloca-se em frascos identificados

com o número do tanque de destino. Repete-se o mesmo procedimento para os valores de biomassa obtidos dos garrafões de *Porphyra umbilicalis*.

10 – Repovoam-se os tanques definidos. Ajustam-se os fluxos de água conforme as renovações de água pretendidas para cada tanque. O arejamento é ajustado de forma a que a alga circule continuamente no tanque, sem se acumular no fundo e/ou se aglomere à superfície.

As taxas de renovação de água variam conforme a estação do ano. Uma vez que, se encontram diretamente relacionadas, com a disponibilidade de nutrientes e com a temperatura da água no tanque. Por exemplo, no verão, é necessário que ocorram mais renovações de água do que no inverno. Isto porque, como no verão as temperaturas são mais elevadas é necessário que haja um maior número de renovações de água para que a temperatura do tanque não aumente. Além disso, havendo maior renovação de água, ocorrerá maior disponibilidade de nutrientes, ou seja, uma maior passagem de nutrientes nos sistemas, pelo que, poderá otimizar a produção de biomassa das macroalgas.

2.9 Manutenção das culturas no exterior

Semanalmente, é realizada a manutenção das culturas à responsabilidade do IDI, das diferentes espécies, que se encontram em cultivo nos tanques de Produção 1 (Figura 16). A manutenção das culturas consiste na pesagem da biomassa com o principal objetivo de ajustar as densidades de cultivo nos tanques. A densidade aplicada é previamente discutida nas reuniões de produção, realizadas semanalmente. Isto porque, a empresa encontra-se num processo de otimização de cultivo e, como tal, tem vindo a testar diferentes densidades de biomassa nos tanques, para concluir qual a mais favorável para as espécies.

Quando existe biomassa suficiente, esta é transferida para tanques de maior volume, até, eventualmente, alcançarem aos tanques de maior capacidade. Por norma, cada espécie possui um dia definido para a sua manutenção, sendo que: a *Porphyra dioica* e *Porphyra umbilicalis* é realizada à segunda-feira, o *Codium tomentosum* à terça-feira e a *Gracilaria* sp. à sexta-feira.

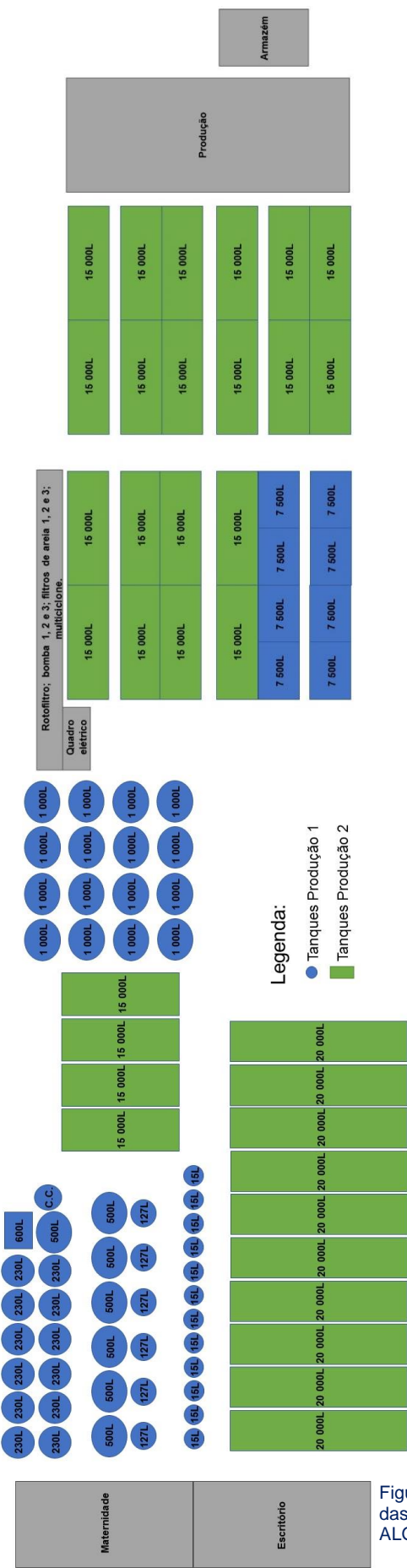


Figura 16 - Esquema da planta das instalações da empresa ALGAplus.

2.9.1 *Porphyra dioica* e *Porphyra umbilicalis*

Na produção de espécies de *Porphyra* no exterior, ao longo das semanas, a biomassa é transferida para tanques de maior capacidade até alcançarem, eventualmente, os tanques de cimento com capacidade de 15 000L.

Na semana em que as lâminas são transferidas do laboratório para o exterior, a *Porphyra dioica* é aclimatada em tanques de 127L e a *Porphyra umbilicalis* em tanques de 230L. Como as lâminas ainda se encontram com dimensões reduzidas, é essencial colocar meias nos filtros de saída, de forma a impedir que escapem do sistema e se perca biomassa. A última fase de cultivo é realizada nos tanques de cimento (15 000L). Apenas se procede à transferência da alga para estes tanques quando se obtiver biomassa suficiente.

A alga é enviada para processamento quando se verifica que os indivíduos demonstram indícios de estar a entrar em fase reprodutiva, uma vez que, após a sua reprodução, as lâminas começam a desfazer-se. Como tal, é necessário observar se as margens das lâminas alteram de cor. Isto é, quando se verifica que estas começam a apresentar uma coloração esverdeadas ou avermelhadas, significa que a alga está a desenvolver as suas estruturas reprodutoras, pelo que, esse lote tem que ser transferido para processamento. Por vezes, verificava-se que a maturação da alga ocorre antes de alcançar os tanques de cimento (15 000L). Nessa situação, o lote é imediatamente enviado para processamento.

É de salientar que, nem sempre é possível seguir este plano em todas as semanas. Isto porque, sendo o cultivo no exterior, é mais difícil controlar as condições ambientais. Contudo, nos tanques de polietileno, é possível exercer controlo em parâmetros como salinidade, temperatura, luz, nutrientes, pH e controlo de pragas, proporcionando uma alta produtividade. Por outro lado, nos tanques de tela e de cimento, a capacidade de controlo é muito menor, apesar de ainda ser possível manipular alguns fatores como a salinidade, transparência da água, concentração de nutrientes e, até mesmo, exercer algum controlo da temperatura, variando a profundidade.

1 – Conforme o plano semanal, coloca-se a baixar o nível de água dos tanques definidos.

2 – Com o auxílio de redes de pesca, colhe-se a alga de cada tanque, para tabuleiros devidamente identificados.

Nos tanques de tela e de cimento, só é possível proceder à colheita da biomassa quando o nível de água baixe o suficiente para que seja possível entrar no tanque de forma segura. A colheita é realizada para caixas de plástico, uma vez que, a quantidade de biomassa é bastante superior, em relação à presente nos tanques de fibra de vidro.

3 – Procede-se à centrifugação e pesagem da biomassa. Ajusta-se a densidade para cada tanque, tendo sempre em consideração os lotes presentes em cada um, e, define-se o seu tanque de destino. Quando possível, a biomassa é transferida para tanques de maior capacidade até, eventualmente, para tanques de tela e, dos tanques de tela para de cimento.

No caso da biomassa colhida dos tanques de tela e de cimento, a alga é transportada para a sala de produção. Coloca-se a alga na centrifugadora para remover o excesso de água e procede-se à pesagem da sua biomassa na balança. Conforme o estado de maturação da alga, a biomassa, ou é devolvida ao tanque, ou é processada. No caso da biomassa dos tanques de polietileno, a centrifugação é realizada de uma forma mais rudimentar. Coloca-se a alga numa rede e espreme-se até que não escorra mais água. Este processo de centrifugação serve para remover o excesso de água. Desta forma, ao realizar a pesagem, a biomassa de todos os tanques encontra-se nas mesmas condições.

4 – Antes de se proceder ao repovoamento dos tanques com a biomassa, efetua-se a lavagem dos mesmos. Desmonta-se o sistema de arejamento e as torneiras. Retiram-se os filtros de saída dos tanques. Todos estes componentes e tanques são lavados com hipoclorito a 20%, preparado a partir de uma solução comercial. Deixa-se o hipoclorito a atuar, e depois, com uma mangueira, lavam-se com água doce até que os vestígios de hipoclorito sejam eliminados. Durante a lavagem, com uma escova, esfrega-se bem as paredes de forma a retirar toda a sujidade e restos de lâminas e/ou outros organismos que estejam presentes. No fim, montam-se os tanques e os sistemas de arejamento e água.

No caso da lavagem dos tanques de tela e de cimento, o procedimento é o mesmo. Contudo, se o fundo do tanque possuir muitos sedimentos e lama, é necessário aspirar com o auxílio de um aspirador de água.

5 – Realiza-se uma purga de todas as torneiras dos tanques, abrindo-as ao máximo e direcionando-as para fora dos tanques. De seguida, colocam-se os filtros, tanto nas torneiras como nos filtros de saída. Colocam-se os tanques a encher.

6 – Ajustam-se os fluxos de água conforme as renovações de água pretendidas para cada tanque. O arejamento é ajustado de forma a que a alga circule de forma contínua no tanque, sem se acumular no fundo e/ou se aglomere à superfície.

7 – Repovoam-se os tanques, colocando a biomassa nos respetivos tanques.

8 – Todo o material usado é lavado e arrumado no devido local.

9 – As placas dos tanques são atualizadas com o novo lote e data da repovoação.

Nota: À medida que se procede à pesagem da biomassa de cada tanque, é necessário que se tenha em atenção para que a alga não fique exposta ao sol. Isto porque, as lâminas de menores dimensões são bastante sensíveis. Além disso, após a pesagem de toda a biomassa, poderá ser necessário juntar alga de diferentes tanques, pelo que, não convém que a alga seque em demasia.

2.9.2 *Codium tomentosum*

1 – Conforme o plano semanal, procede-se à colheita da alga dos tanques de 15L, 230L e 500L, com o auxílio de redes de pesca, para caixas de plástico.

No caso de haver alga num tanque de tela, coloca-se o tubo de saída de água para baixo, de forma a baixar o nível de água e a facilitar a colheita da biomassa. Assim que possível, procede-se à colheita da biomassa, com o auxílio de redes de pesca, para caixas de plástico.

2 – Após a colheita da alga dos tanques de 230L e de 500L, esvaziam-se os tanques, com o auxílio de uma porção de mangueira, aplicando-se a técnica do sifão.

3 – Procede-se à centrifugação e pesagem da biomassa. Realiza-se o ajuste de densidade para cada tanque, tendo sempre em consideração os lotes de cada um, e, define-se o seu tanque de destino.

No caso da biomassa colhida dos tanques de tela, a alga é transportada para a sala de produção. Coloca-se a alga na centrifugadora para remover o excesso de água e procede-se à pesagem da sua biomassa na balança. A alga ou é devolvida ao tanque, ou é processada. No caso da biomassa dos tanques de polietileno, a centrifugação é realizada com o auxílio de uma saladeira de cozinha, que possibilita a remoção da água em excesso.

Os pontos 4, 5, 6, 7, 8, e 9 são iguais aos descritos no procedimento 2.2.1 *Porphyra dioica* e *Porphyra umbilicalis*.

2.9.3 *Gracilaria* sp.

1 – Após a verificação do plano semanal, procede-se à colheita da alga dos tanques de 500 L definidos, com o auxílio de redes de pesca, para caixas de plástico.

2 – Após a colheita da alga, esvazia-se os tanques, com o auxílio de uma porção de mangueira, aplicando a técnica do sifão.

3 – Com auxílio de redes de pesca, colhe-se a alga dos tanques de 500 L.

4 – Procede-se à centrifugação e pesagem da biomassa. A alga é transportada para a sala de produção. Coloca-se a alga na centrífuga para remover o excesso de água e procede-se à pesagem da sua biomassa na balança. Realiza-se o ajuste de densidade para cada tanque, tendo sempre em consideração os lotes de cada um e define-se o seu tanque de destino.

Os pontos 4, 5, 6, 7, 8, e 9 são iguais aos descritos no procedimento 2.2.1 *Porphyra dioica* e *Porphyra umbilicalis*.

2.10 Rotinas diárias Produção 1 e Produção 2

As rotinas diárias são realizadas diariamente, às 8h00 da manhã.

2.10.1 Verificação dos tanques

Realiza-se uma verificação de todos os tanques, de forma a assegurar que nenhum tenha transbordado durante a noite, ou ficado sem fluxo de água.

Nos tanques de Produção 1, verificam-se se os arejamentos de ar se encontram devidamente adequados para a espécie de alga no tanque, e se a alga se mantém em constante movimento, sem nunca ficar acumulada no fundo do tanque ou à superfície da água.

Nos tanques de *Gracilaria* sp., de *Porphyra dioica* e de *Porphyra umbilicalis*, o arejamento é regulado no mínimo, de forma a que a alga se mantenha em constante movimento. Nos tanques de *Codium tomentosum*, o arejamento é regulado de forma a que ficasse acelerado, mantendo um movimento constante e mais rápido da alga.

Retira-se a *Ulva intestinalis* que esteja presente nos tanques, uma vez que, irá contaminar e competir com a espécie em cultivo. Além disso, dificulta o processamento da espécie em cultivo, pois implica realizar um processo de seleção e escolha, com o intuito de retirar todos os indivíduos de *Ulva intestinalis*.

Nos tanques de Produção 2, caso haja alga acumulada à superfície, procede-se ao seu afundamento com o auxílio de um instrumento tipo forquilha. Isto porque, a alga que ficar acumulada à superfície irá impedir a captação de luz da restante alga que estiver a circular no tanque. Este impedimento irá afetar negativamente o processo de fotossíntese, uma vez que, como os indivíduos não são capazes de captar a luz, não irão realizar o processo de fotossíntese nem produzir biomassa. Como tal, é necessário que toda a alga do tanque se mantenha em circulação contínua.

2.10.2 Filtros de saída de água dos tanques da Produção 1:

Devolve-se a alga que se encontra nas redes colocadas nos tubos de saída de água dos tanques. Estas redes encontram-se nos tanques de *Porphyra dioica* e *Porphyra umbilicalis*, quando as lâminas possuem dimensões que possam escapar pelos filtros de saída.

Limpam-se os filtros de saída de todos os tanques de Produção 1. Sempre que o filtro se encontra muito sujo, procede-se à sua substituição para impedir que o tanque transborde. Os filtros são colocados num balde com água e hipoclorito. Na substituição dos filtros é necessário ter sempre em atenção em nunca colocar filtros danificados, com as redes rasgadas ou soltas, por onde se poderia perder alga.

2.10.3 Tubos de saída de água dos tanques da Produção 2:

Realiza-se uma purga nos tubos de saída de água dos tanques colocando-os completamente para baixo. Desta forma, é retirada toda a lama e sedimentos que estejam presentes no sistema.

2.10.4 Filtros de entrada de água nos tanques:

Os filtros que se encontram nas torneiras de cada tanque, são retirados e colocadas num balde com água e hipoclorito.

Nos tanques de Produção 1, direcionam-se cada uma das torneiras para fora do tanque e abrem-se ao máximo, de forma a fazer uma purga. Desta forma, é possível retirar qualquer sedimento que possa estar no sistema.

Dos filtros previamente lavados, descartam-se os que estejam danificados e colocam-se nas torneiras os que se encontrarem em bom estado. Com recurso a um medidor e a um cronómetro, procede-se ao ajuste dos fluxos de água, que varia consoante as renovações de água pretendidas para cada espécie. Além disso, as renovações de água, como referido anteriormente, variam consoante a estação do ano como consequência da temperatura e da disponibilidade de nutrientes.

Lavam-se os filtros de saída e os filtros das torneiras, até se assegurar que não contêm vestígios de hipoclorito, de forma a ficarem utilizáveis para o dia seguinte.

2.10.5 Filtros mecânicos de água salgada

No exterior do laboratório encontram-se 3 filtros mecânicos de água salgada, com o objetivo de reterem matéria orgânica e partículas em suspensão. A porosidade dos filtros pode variar entre 20 μm e 0,2 μm .



Figura 17 - Filtros mecânicos de água salgada desde 0,2 μm , 10 μm e 20 μm , situados no exterior do laboratório.

- 1 – Retiram-se os filtros e verifica-se se é necessário substituir algum;
- 2 – De seguida, procede-se à lavagem dos filtros com água doce, até que todos os vestígios de sedimentos ou partículas sejam eliminados;
- 3 – Caso a lavagem com água doce não seja suficiente, procede-se à substituição dos filtros por uns novos. Colocam-se os filtros usados num balde com água e hipoclorito. Os filtros retirados são lavados no dia seguinte, com água doce até se assegurar que todos os vestígios de hipoclorito são eliminados;
- 4 – No final, colocam-se os filtros pela ordem correta, 0,2 μm , 10 μm e 20 μm (da esquerda para a direita, ver Figura 17). O filtro tem que ser bem colocado no interior do copo e enroscado de forma a que não haja fuga de água. Como tal, é importante ter em atenção a que a borracha que se encontra no copo esteja bem colocada de forma a selar corretamente.

A ordem de montagem é fundamental. Isto porque a água salgada, em primeiro lugar, irá passar pelo filtro de maior porosidade, de 20 μm , retirando os sedimentos em suspensão de maiores dimensões. De seguida, passa pelo filtro de 10 μm que, tendo uma porosidade inferior, é capaz de retirar sedimentos que passaram pelo primeiro filtro. Por fim, a água passa pelo filtro de 0,2 μm , que impede a passagem de microrganismos e micropartículas que possam estar suspensos na água.

É bastante importante colocar os filtros pela ordem correta. Caso contrário, se o filtro de menor porosidade for colocado no copo onde deve ser colocado o filtro de 20 μ m (maior porosidade), o que iria acontecer é que o filtro de 0,2 μ m iria colmatar imediatamente com as partículas de maiores dimensões, uma vez que estas iriam ficar retidas.

No final das rotinas diárias, todo o material que ficou por arrumar no dia anterior, é colocado no devido local e procede-se ao registo no NAVIA toda a informação pertinente referente às rotinas diárias.

3. Ensaio Experimental

O objetivo do ensaio experimental é verificar se a bioatividade dos extratos de espécies de duas macroalgas (*Fucus vesiculosus* e *Ulva rigida*) e de uma microalga (*Nannochloropsis gaditana*) produzem algum efeito sobre o crescimento e a saúde do peixe-zebra (*Danio rerio*, Hamilton 1822), de forma a avaliar a sua adequação como ingredientes para alimento para peixes, nomeadamente, para corvina (*Argyrosomus regius*, Asso 1801).

3.1 Métodos

3.1.1 Extratos de algas

Foram utilizadas duas espécies de macroalgas, *Fucus vesiculosus* (Phaeophyta) e *Ulva rigida* (Chlorophyta), que foram obtidas da empresa ALGAplus (Ílhavo, Portugal), e uma espécie de microalga, *Nannochloropsis gaditana* (Eustigmatophyceae), que foi obtida na empresa Buggy Power S.L. (San Pedro del Pinatar, Múrcia, Espanha). A seleção das espécies de algas a ser utilizadas foi realizada com base no seu perfil antibacteriano e antiviral, mas também com o intuito de valorizar produtos de economia portuguesa. Os extratos de algas foram preparados a partir da liofilização da biomassa das macroalgas e da microalga, conforme descrito em Monteiro *et al.* (2018). As amostras das algas liofilizadas e moídas (75 mg DW), foram misturadas com 1,5 mL de mistura de solventes, metanol/água (M50:50) para as macroalgas, e etanol/água (E80:20) para a espécie de microalga. De seguida, com o auxílio de um vórtex, procedeu-se à sua agitação. Colocou-se a incubar no escuro, durante 30 minutos, com agitação orbital contínua, à temperatura ambiente (AG).

Cada mistura foi centrifugada durante 15 minutos a 10.600 x g a 4°C, o sobrenadante foi recolhido. Repetiu-se 3 vezes este procedimento, e reuniu-se os sobrenadantes das extrações sucessivas.

O volume final foi completado para 5 mL com os respetivos solventes. Procedeu-se à filtração dos extratos através de filtros de 0,22 µm (Millex HV13, Millipore, Bedford, MA, EUA) e foram mantidos a 4 °C, no escuro.

Na escolha do método de extração utilizado, teve-se em consideração o apresentava ser o mais económico, um melhor rendimento da biomassa, melhor capacidade antioxidante global e menor impacto ambiental.

3.1.2 Dietas experimentais

Neste estudo, foram utilizadas 9 dietas. Foi formulada uma dieta basal, composta por ingredientes vegetais (glúten milho, soja, farinha de trigo, girassol) como principais fontes proteicas, e óleo de fígado de bacalhau como principal fonte lipídica. A dieta basal foi considerada um controlo negativo (D1) porque foi formulada para induzir um *stress* nutricional nos peixes e promover inflamação intestinal, de modo a permitir perceber se a suplementação com o extrato melhorava o estado de saúde dos animais.

Tabela 9 – Ingredientes das dietas experimentais.

	Dieta								
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
Ingredientes (% peso seco)									
Farinha de peixe LT	-	-	-	-	-	-	-	-	21,8
CPSP	2	2	2	2	2	2	2	2	-
Glúten milho	12,2	12,2	12,2	12,2	12,2	12,2	12,2	12,2	5
Soja	20	20	20	20	20	20	20	20	10
Colza	10	10	10	10	10	10	10	10	-
Farinha Trigo	13	13	13	13	13	13	13	13	48,5
DDGS	10	10	10	10	10	10	10	10	-
Girassol	10	10	10	10	10	10	10	10	-
Óleo fígado de bacalhau	12,9	12,9	12,9	12,9	12,9	12,9	12,9	12,9	10,6
Vitaminas	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Minerais	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cloreto de colina	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ligante	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Taurina	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	-
Fosfato Mono Amónico	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1	0,6
Lysina	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
Betaína	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
Celulose	3	2	2	2	1	1	1	-	-
<i>Fucus vesiculosus</i>	-	1	-	-	1	1	-	1	-
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	-	-	1	-	1	-	1	1	-
<i>Ulva rigida</i>	-	-	-	1	-	1	1	1	-

Foram formuladas outras 7 dietas experimentais, semelhantes a D1, mas com suplementação de extratos de algas, em substituição da celulose: 1% de extrato *Fucus vesiculosus* (D2), 1% extrato de *Nannochloropsis gaditana* (D3), 1% de extrato de *Ulva rigida* (D4), 1% de extrato de *Fucus vesiculosus* e 1% de extrato *Nannochloropsis*

gaditana (D5), 1% de extrato *Fucus vesiculosus* e 1% de extrato *Ulva rigida* (D6), 1% de extrato *Nannochloropsis gaditana* e 1% de extrato *Ulva rigida* (D7), 1% de extrato *Fucus vesiculosus*, 1% de extrato *Nannochloropsis gaditana* e 1% de extrato *Ulva rigida* (D8).

Foi ainda formulada uma dieta controlo positivo (D9), a qual possuía uma composição ideal e com elevado teor em farinha de peixe, enquanto que, nenhuma das restantes dietas possuía este ingrediente na sua composição. Além disso, nesta dieta, diminuiu-se o teor de soja e não se adicionou girassol, uma vez que estes ingredientes provocam inflamações a nível intestinal.

Para a produção das 9 dietas experimentais, todos os ingredientes em pó foram bem misturados e, de seguida, adicionou-se o óleo fígado de bacalhau e água para se obter uma mistura húmida. A mistura foi peletizada, com o auxílio de um moedor. Os *pellets* obtidos foram colocados a secar, numa estufa a 40°C, durante 24h. Os ingredientes das dietas experimentais encontram-se representados na Tabela 9.

3.1.3 Ensaio experimental

O ensaio foi realizado no departamento de Biologia da Faculdade de Ciências do Porto.

Foram utilizados 540 juvenis de peixe-zebra (*Denio rerio*), gerados a partir de reprodutores *wild-type*, com peso inicial médio de $0,08 \pm 0,01$ g. Os peixes foram pesados e distribuídos em grupos de 30, de forma aleatória, por 18 tanques. O ensaio foi realizado num sistema fechado com recirculação de água, com regulação térmica a 28 ± 1 °C e fotoperíodo a 14:10 horas de luz-escuridão.

Uma vez que o sistema no qual se iria realizar o ensaio era o mesmo onde os juvenis se encontravam, não foi necessário submeter os indivíduos a um período de adaptação. Foram selecionados peixes em fase juvenil para este estudo, uma vez que se caracterizam por possuírem um rápido crescimento e respostas rápidas a estímulos que lhes são fornecidos.

Cada tanque (unidade experimental), é constituída por dois tanques de plástico: um interior mais pequeno e com um volume de 10L (onde se encontram os peixes do ensaio), e um tanque exterior, servindo para a manutenção do nível da água. Além disso, a existência deste tanque exterior é importante para evitar que os peixes escapem do sistema, caso consigam saltar do tanque interior. De forma a minimizar o *stress* causado nos indivíduos, é colocada uma rede na parte superior dos tanques. As dietas experimentais foram atribuídas aleatoriamente a cada tanque, em duplicado. Uma vez que o número de tanques no sistema era limitado, apenas foi possível testar as dietas

em duplicado. Contudo, este ensaio encontrava-se dividido em dois blocos. O presente trabalho refere-se apenas ao primeiro bloco que tive a oportunidade de acompanhar.

A ração era fornecida à mão, duas vezes por dia, às 10h da manhã e às 17h da tarde, durante um período de 30 dias. O fornecimento da ração era realizado até saciedade aparente, ou seja, sem sobrealimentar nem desperdiçar ração. Este procedimento era realizado num tanque de cada vez. As partículas das dietas eram fornecidas em pequenas quantidades e, quando se observava que os peixes terminavam a sua atividade de alimentação, passava-se para o tanque seguinte. Eram realizados dois ciclos consecutivos em cada refeição. Foi tomado em atenção que toda a ração fornecida era consumida e de forma a prevenir a sub-saciação. Todas as semanas procedia-se à pesagem da ração no início e no final para calcular a quantidade consumida pelos peixes em cada tanque.

Para evitar o enviesamento dos resultados durante o fornecimento das dietas, todos os recipientes com as dietas experimentais encontravam-se codificados, para que não fosse possível distinguir que dieta estava a ser fornecida a cada tanque.

Diariamente, após o fornecimento da última refeição do dia, procedia-se à limpeza de todos os tanques, efetuando-se uma sifonagem do fundo dos tanques, removendo as fezes das unidades experimentais. Este procedimento realizava-se após a distribuição das dietas, para evitar *stressar* os peixes ao ponto de os inibir de se alimentarem. Os indivíduos mortos eram retirados, contados e pesados.

3.1.4 Amostragem

Ao fim de 30 dias realizou-se a amostragem de todos os tanques do ensaio. Os indivíduos sobreviventes de cada tanque foram capturados, com o auxílio de uma rede, e eutanasiados com 2-fenoxietanol (0,3 mL/L). Retirou-se a água em excesso com toalhetes de papel e, de seguida, procedeu-se à contagem e pesagem dos indivíduos numa balança eletrónica com precisão de 0,01 g.

De seguida, foram colhidas amostras de 2 indivíduos de cada tanque, para análise posterior a nível histológico e quantificação de expressão de genes. Como tal, com o auxílio de uma lupa binocular, procedeu-se à remoção de intestino, fígado e parte do músculo dos juvenis. Os indivíduos, escolhidos de forma aleatória para este procedimento, foram colocados em gelo de forma a retardar as reações químico-enzimáticas, envolvidas no processo de autólise, e retardar o desenvolvimento bacteriano, que contribui para a deterioração dos indivíduos. Após a recolha, as amostras para histologia (intestino) foram colocadas em formol tamponado (4%, pH 7) e

as amostras para quantificação da expressão génica (intestino, fígado e músculo) colocadas em RNAlater e armazenadas a -80°C até se proceder à sua análise. No âmbito do meu trabalho não foram realizadas as análises histológica e de quantificação génica, apenas foram analisados os dados zootécnicos.

3.1.5 Análise estatística

Com os dados obtidos calculou-se: ganho em biomassa (g), sobrevivência (%), consumo diário de ração (DFC), taxa de crescimento diário (DGI) e taxa de conversão alimentar (FCR). Estes parâmetros foram calculados a partir das seguintes equações:

$$\text{Ganho em biomassa (g)} = \text{Peso final por peixe (g)} - \text{Peso inicial por peixe (g)}$$

$$\text{Sobrevivência (\%)} = \frac{\text{Número final de peixes}}{\text{Número inicial de peixes}} \times 100$$

$$\text{Consumo diário de ração (DFC)} = \frac{\text{Ração consumida (g)}}{\text{Número final de peixes} \times \text{tempo em dias}}$$

$$\text{Taxa de crescimento diário (DGI)} = \frac{\text{Peso final por peixe}^{\frac{1}{3}} - \text{Peso inicial por peixe}^{\frac{1}{3}}}{\text{Tempo em dias}} \times 100$$

$$\text{Taxa de conversão alimentar (FCR)} = \frac{\text{Ração consumida por peixe (g)}}{\text{Ganho em biomassa por peixe (g)}}$$

Todos os dados foram analisados estatisticamente utilizando *one-way analysis of variace* (*one-way* ANOVA), para comparar variâncias dos resultados obtidos nos diferentes parâmetros das dietas experimentais. As comparações múltiplas foram realizadas com teste Tukey ($\alpha = 0,05$). A análise estatística foi realizada através do *software* de estatística IBM *Statistical Package for the Social Sciences* versão 23 (SPSS). Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando se verificou que $P < 0,05$.

3.2 Resultados

O desempenho do crescimento encontra-se representado na Tabela 10. O crescimento foi avaliado através dos dados relativos ao peso final (g), ganho em biomassa (g), DFC, DGI e FCR, relativamente às 9 dietas experimentais em estudo: D1 = 0% alga; D2 = 1% *Fucus vesiculosus*; D3 = 1% *Nannochloropsis gaditana*; D4 = 1% *Ulva rigida*; D5 = 1% *Fucus vesiculosus* + 1% *Nannochloropsis gaditana*; D6 = 1% *Fucus vesiculosus* + 1% *Ulva rigida*; D7 = 1% *Nannochloropsis gaditana* + 1% *Ulva rigida*; D8 = 1% *Fucus vesiculosus* + 1% *Nannochloropsis gaditana* + 1% *Ulva rigida*; D9 = Farinha de peixe.

Tabela 10 – Dados de crescimento dos peixe-zebra, com peso inicial de 0,08 g, alimentados com as diferentes dietas experimentais (média \pm desvio-padrão, peso inicial n=30; restantes parâmetros n=22 em D1 e n=21 nas restantes dietas). Diferentes letras, na mesma linha, indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).

Índice	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
Peso final (g)	0,15 \pm 0,04 ^a	0,15 \pm 0,03 ^a	0,17 \pm 0,03 ^a	0,16 \pm 0,03 ^a	0,17 \pm 0,03 ^a	0,16 \pm 0,02 ^a	0,14 \pm 0,01 ^a	0,15 \pm 0,03 ^a	0,29 \pm 0,02 ^b
Ganho em biomassa (g)	0,07 \pm 0,02 ^a	0,07 \pm 0,01 ^a	0,09 \pm 0,01 ^a	0,08 \pm 0,03 ^a	0,09 \pm 0,01 ^a	0,08 \pm 0,02 ^a	0,07 \pm 0,0 ^a	0,07 \pm 0,03 ^a	0,21 \pm 0,01 ^b
Sobrevivência (%)	72 \pm 2,36	70 \pm 0,0	70 \pm 0,0	70 \pm 0,0	70 \pm 0,0	70 \pm 0,0	70 \pm 0,0	70 \pm 0,0	70 \pm 0,0
DFC (g/dia)	0,55 \pm 0,04	0,55 \pm 0,01	0,55 \pm 0,18	0,58 \pm 0,22	0,54 \pm 0,28	0,57 \pm 0,01	0,55 \pm 0,01	0,54 \pm 0,04	0,66 \pm 0,01
DGI	0,32 \pm 0,07 ^a	0,33 \pm 0,04 ^a	0,42 \pm 0,04 ^a	0,35 \pm 0,1 ^a	0,41 \pm 0,02 ^a	0,34 \pm 0,06 ^a	0,32 \pm 0,02 ^a	0,34 \pm 0,12 ^a	0,76 \pm 0,04 ^b
FCR	1,4 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1	1,2 \pm 0,4	1,5 \pm 0,8	1,2 \pm 0,1	1,4 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1	1,4 \pm 0,4	1,1 \pm 0,1

Os resultados nos parâmetros relativos ao peso final (g), ganho em biomassa (g) e DGI, foram significativamente diferentes entre D9 e as restantes dietas experimentais ($P < 0,05$).

Relativamente à taxa de sobrevivência, os resultados obtidos demonstraram que D1 apresentou um maior valor absoluto relativamente à taxa de sobrevivência (72%), no entanto, não foram verificadas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos ($P > 0,05$).

O consumo diário da ração, variou entre 0,54 e 0,66 g/dia. Não foram detetadas diferenças significativas entre as diferentes dietas ($P > 0,05$). Contudo, a D9 apresentou um maior valor de DFC (0,66 g/dia), enquanto que, as restantes dietas experimentais apresentaram um DFC que variou entre 0,54 e 0,58 g/dia. As dietas D3 e D5, contendo 1% *Nannochloropsis gaditana* e 1% *Fucus vesiculosus* + 1% *Nannochloropsis gaditana*, respetivamente, resultaram em melhor performance para os peixes, embora não seja estatisticamente significativo.

A taxa de conversão alimentar variou entre 1,1 e 1,5, sem apresentar diferenças significativas entre os diferentes tratamentos ($P > 0,05$). Sendo que, D9 apresentou um menor valor absoluto de FCR (1,1) e D4 o maior valor absoluto (1,5).

3.3 Discussão

Os peixes-zebra alimentados com a dieta controlo-positivo apresentaram uma melhor performance de crescimento, comparativamente com os indivíduos das restantes dietas experimentais. É de salientar, que esta era a única dieta que apresentava farinha de peixe na composição (21,8% peso seco), enquanto que, nas restantes dietas a farinha de peixe foi substituída por ingredientes de origem vegetal.

Segundo os resultados obtidos no que diz respeito ao ganho em biomassa, verificou-se uma diferença significativa entre D9 e as restantes dietas experimentais. Esta diferença, poderá estar relacionada com o aumento de utilização da proteína, uma vez que, a principal fonte de proteína em D9 é farinha de peixe, enquanto que nas restantes dietas restringe-se a ingredientes vegetais, tais como, glúten de milho, soja, farinha de trigo e girassol. Tal facto pode estar relacionado com a farinha de peixe ser mais facilmente digerida do que as farinhas de origem vegetal, apresentando um elevado teor de proteínas, excelente perfil de aminoácidos, alta digestibilidade dos nutrientes, falta geral de antinutrientes (Gatlin *et al.*, 2007). Vários estudos comprovam que, as matérias primas de origem vegetal, possuem uma ampla variedade de fatores antinutricionais. Por exemplo, a farinha de soja apresenta, na sua composição, inibidores da protease, lectinas, ácido fítico, saponinas, fitoestrogénios, antivitaminas e alergénios (Francis *et al.*, 2001). Estes fatores antinutricionais, podem alterar a histomorfologia intestinal e comprometer a sua função de absorção de nutrientes. Como tal, no momento da amostragem do presente estudo, procedeu-se à recolha de amostras de intestino dos indivíduos sujeitos às diferentes dietas experimentais, com o objetivo de se avaliar o seu estado.

No presente estudo, a taxa de crescimento diário, bem como, a média de peso final e a média de ganho de biomassa, apresentam valores superiores em comparação com resultados de outros estudos realizados com peixe-zebra (Jaya-Ram *et al.*, 2008). Observando-se um maior crescimento nos peixes-zebra (ganho em biomassa = 0,21 g versus 0.15 g). Contudo, este valor corresponde a D9, que, no ensaio realizado, demonstra ser a dieta ideal e que promoveu uma melhor performance de crescimento nos indivíduos. É de salientar que as dietas experimentais por Jaya-Ram *et al.* (2008) são formuladas à base de ingredientes de origem animal, tendo uma inclusão de 35% de farinha de peixe, o que vai de encontro à composição da D9, utilizada no presente estudo, que possui uma inclusão de 21,8%, indicando uma boa performance do lote utilizado na presente experiência.

Em contrapartida, as restantes dietas experimentais apresentaram um ganho em biomassa que variou entre 0,07 e 0,09 g, valores bastante inferiores ao estudo realizado por Jaya-Ram *et al.* (2008). Contudo, comparando os resultados obtidos o estudo realizado por Karga & Mandal (2017), também com peixe-zebra, verificou-se que o ganho em biomassa foi de 0,057 g, bastante inferior ao valor obtido para D9 no presente estudo, mas relativamente próximo aos valores obtidos nas restantes dietas experimentais. Tal facto poderá estar relacionado por as dietas utilizadas por Karga & Mandal (2017), possuírem ingredientes de origem vegetal. É necessário ter em consideração que os resultados da performance de crescimento são amplamente afetados por diversos fatores, nomeadamente, o estágio de vida, as espécies, as condições experimentais, entre outros (Yousefi *et al.*, 2018).

Estudos realizados com espécies de *Ulva*, demonstraram o potencial da sua inclusão em dietas para animais aquáticos. Estes resultados dependem da forma de como é utilizada na dieta, nomeadamente, como farinhas, extratos brutos ou purificados e dos seus componentes. Por outro lado, a performance de crescimento pode ser diferente de espécie para espécie, consoante a variabilidade biológica entre peixes, e não pela administração do extrato (Akbari & Aminikhoei, 2018). Contudo, segundo os resultados obtidos, verifica-se que os grupos alimentados com as dietas com extrato de *Ulva rigida* (D4, D6, D7 e D8), foram os grupos que apresentaram uma pior performance de crescimento.

Apesar de não existirem diferenças significativas entre os grupos alimentados com as dietas experimentais D1 a D8, verificou-se que, tanto D3 como D5, apresentaram uma performance de crescimento superior aos restantes tratamentos (excluindo D9). Ambas as dietas apresentavam inclusão de extrato da microalga *Nannochloropsis gaditana* (sendo que D3 = 1% *Nannochloropsis gaditana* e D5 = 1% *Fucus vesiculosus* + 1% *Nannochloropsis gaditana*). Segundo estudos realizados, esta microalga possui um efeito protetor contra a farinha de soja, impedindo a inflamação intestinal, devido ao aumento da quantidade de neutrófilos presentes no intestino (Bravo-Tello *et al.*, 2017). Estes resultados vão de encontro a outros estudos realizados, nos quais afirmam que a suplementação de dietas com microalgas, promovem a produção de muco e do número de células *globet* no intestino, tanto em *Salmo salar* como em *Lutjanus peru* (Reyes-Becerril *et al.*, 2014; Kousoulaki *et al.*, 2015). Uma vez que, o muco representa ser uma barreira física protetora do intestino a diferentes fatores de stress, o aumento do muco pode ajudar a prevenir os efeitos nocivos da farinha de soja (Bravo-Tello *et al.*, 2017). Os dados obtidos na análise histológica e na quantificação da expressão de genes associados à resposta imune poderão ajudar a

explicar os resultados obtidos a nível zootécnico, no entanto essas análises não foram realizadas no âmbito do presente estudo.

Relativamente à taxa de sobrevivência, não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos demonstrando que as dietas não estão relacionadas com a mortalidade dos indivíduos.

Há muito que se supõe que os peixes, tal como outros animais, regulam a ingestão de alimentos para atenderem às suas necessidades energéticas (Yamamoto *et al.*, 2000) e proteicas (Peres & Oliva-Teles, 1999; Geurden *et al.*, 2006). Neste ensaio, verificou-se que a dieta experimental que promoveu um maior crescimento, foi a que apresentou um maior consumo diário de ração (D9), apesar de não haver diferenças significativas entre grupos. Este maior consumo de ração observado, poderá estar relacionado com a palatabilidade da ração, demonstrando assim uma preferência pela dieta controlo positivo (D9), devido à presença de farinha de peixe na sua composição.

Apesar de se observar um menor valor absoluto da taxa de conversão alimentar em D9, não se registaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. As restantes dietas apresentaram um maior FCR, sugerindo uma menor eficiência de utilização das dietas por parte dos indivíduos. O menor crescimento e o maior FCR, observado nas dietas experimentais com inclusão de extratos de algas, pode estar relacionado com a redução da digestibilidade das mesmas, devido à possível presença de fatores antinutricionais (Crevieu-Gabriel, 1999) e elevada percentagem de fibra, o que poderá conduzir a efeitos adversos observados, tanto a nível do seu valor nutricional como a nível da sua palatabilidade (Kaushik, 1989). Em contrapartida, a presença de farinha de peixe em D9 pode promover a performance de crescimento devido à melhor digestão e absorção dos nutrientes (Miles & Chapman, 2006). Excluindo D9, as dietas experimentais que apresentaram menor valor absoluto de FCR e maior de DGI foram D3 e D5.

A dieta controlo positivo promoveu um maior crescimento nos peixes-zebra testados, demonstrando diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. Contudo, dentro das restantes dietas experimentais, verificou-se que as dietas que promoveram um maior crescimento foram D3 e D5, apesarem de não se verificar uma diferença significativa. Com base nos resultados obtidos, os melhores extratos a incluir na dieta são os de *Nannochloropsis gaditana* e *Fucus vesiculosus*. No entanto, estes resultados serão complementados com os que irão ser obtidos na análise histológica e na quantificação génica.

4. Referências Bibliográficas

- Abdel-Warith, A. W. A., Younis, E. S. M., & Al-Asgah, N. A. (2016). **Potential use of green macroalgae *Ulva lactuca* as a feed supplement in diets on growth performance, feed utilization and body composition of the African catfish, *Clarias gariepinus*.** Saudi journal of biological sciences, 23(3), 404-409.
- Abreu, M. H., Pereira, R., Yarish, C., Buschmann, A. H., & Sousa-Pinto, I. (2011). **IMTA with *Gracilaria vermiculophylla*: productivity and nutrient removal performance of the seaweed in a land-based pilot scale system.** Aquaculture, 312(1-4), 77-87.
- Abreu, M. H., Sousa, P., & Pereira, R. P. (2016). **Cultivo Integrado de *Gracilaria* nas Aquaculturas da Ria de Aveiro, Relatório Técnico Final - Resumo.** Ílhavo. 1-13 pp.
- Akbary, P., & Aminikhoei, Z. (2018). **Effect of water-soluble polysaccharide extract from the green alga *Ulva rigida* on growth performance, antioxidant enzyme activity, and immune stimulation of grey mullet *Mugil cephalus*.** Journal of applied phycology, 30(2), 1345-1353.
- Aleström, P., Holter, J. L., & Nourizadeh-Lillabadi, R. (2006). **Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine.** Trends in biotechnology, 24(1), 15-21.
- AlgaeBase. Acedido a 13 de setembro de 2019, disponível em <http://www.algaebase.org/>
- Araújo, M., Rema, P., Sousa-Pinto, I., Cunha, L. M., Peixoto, M. J., Pires, M. A., ... & Valente, L. M. (2016). **Dietary inclusion of IMTA-cultivated *Gracilaria vermiculophylla* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: effects on growth, intestinal morphology, tissue pigmentation, and immunological response.** Journal of applied phycology, 28(1), 679-689.
- Armisen, R. (1995). **World-wide use and importance of *Gracilaria*.** Journal of applied phycology, 7(3), 231.
- Azaza, M. S., Mensi, F., Ksouri, J., Dhraief, M. N., Brini, B., Abdelmouleh, A., & Kraiem, M. M. (2008). **Growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed with diets containing graded levels of green algae ulva meal (*Ulva rigida*) reared in geothermal waters of southern Tunisia.** Journal of Applied Ichthyology, 24(2), 202-207.

- Barbier, M., Charrier, B., Araujo, R., Holdt, S.L., Jacquemin, B. & Rebours, C. (2019). **PEGASUS - PHYCOMORPH European Guidelines for a Sustainable Aquaculture of Seaweeds**, COST Action FA1406 (M. Barbier and B. Charrier,Eds), Roscoff, France.<https://doi.org/10.21411/2c3w-yc73>
- Baweja, P., Kumar, S., Sahoo, D., & Levine, I. (2016). **Biology of seaweeds**. In Seaweed in Health and Disease Prevention (pp. 41-106). Academic Press.
- Beveridge, M. C. M. (1996) **Cage aquaculture. 2nd ed.** Oxford: Fishing News Books, 346pp.
- Bicudo, C. E.M., & Menezes, M. (2010) **Introdução: As algas do Brasil**. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 49-60. Vol. 1. ISBN 978-85-8874-242-0. Disponível em <http://books.scielo.org>
- Bikker, P., van Krimpen, M. M., van Wikselaar, P., Houweling-Tan, B., Scaccia, N., van Hal, J. W., ... & López-Contreras, A. M. (2016). **Biorefinery of the green seaweed *Ulva lactuca* to produce animal feed, chemicals and biofuels**. Journal of applied phycology, 28(6), 3511-3525.
- Bixler, H. J., & Porse, H. (2011). **A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry**. Journal of applied Phycology, 23(3), 321-335.
- Blender, A. E. (1967) **Dietetic foods**. Leonard Hill Books, London, 211 pp.
- Bocanegra, A., Bastida, S., Benedi, J., Rodenas, S., & Sanchez-Muniz, F. J. (2009). **Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds**. Journal of medicinal food, 12(2), 236-258.
- Braune, W., & Guiry, M. D. (2011). **Seaweeds: A colour guide to common benthic green, brown and red algae of the world's oceans**. A.R.G. Gantner: Ruggell. ISBN 978-3-906166-90-2. 601 pp.
- Bravo-Tello, K., Ehrenfeld, N., Solís, C. J., Ulloa, P. E., Hedrera, M., Pizarro-Guajardo, M., ... & Feijóo, C. G. (2017). **Effect of microalgae on intestinal inflammation triggered by soybean meal and bacterial infection in zebrafish**. PloS one, 12(11), e0187696.
- Briggs, M. R. P., & Funge-Smith, S. J. (1996). **The potential use of *Gracilaria* sp. meal in diets for juvenile *Penaeus monodon* Fabricius**. Aquaculture research, 27:345–354.

- Brodie, J., & Irvine, L. M. (1997). **A comparison of *Porphyra dioica* sp. nov. and *P. purpurea* (Roth) C. Ag. (Rhodophyta: Bangiophycidae) in Europe.** Cryptogamie Algologie, 18 (3), 283-297.
- Buschmann, A. H., Camus, C., Infante, J., Neori, A., Israel, Á., Hernández-González, M. C., ... & Critchley, A. T. (2017). **Seaweed production: overview of the global state of exploitation, farming and emerging research activity.** European Journal of Phycology, 52(4), 391-406.
- Cairrao, E., Couderchet, M., Soares, A. M. V. M., & Guilhermino, L. (2004). **Glutathione-S-transferase activity of *Fucus* spp. as a biomarker of environmental contamination.** Aquatic Toxicology, 70(4), 277-286.
- Castro, R., Piazzon, M. C., Zarra, I., Leiro, J., Noya, M., & Lamas, J. (2006). **Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides.** Aquaculture, 254(1-4), 9-20.
- Castro, R., Zarra, I., & Lamas, J. (2004). **Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes.** Aquaculture, 229(1-4), 67-78.
- Cheng, A. C., Chen, Y. Y., & Chen, J. C. (2008). **Dietary administration of sodium alginate and κ-carrageenan enhances the innate immune response of brown-marbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*.** Veterinary immunology and immunopathology, 121(3-4), 206-215.
- Chopin, T., Buschmann, A.H., Troell, M., Kautsky, N., Neori, A., Yarish, C., *et al.* (2001) **Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability.** Journal of Phycology, 37(6), 975-986.
- Christiansen, E. R. (2017). **The potential of *Ulva* for bioremediation and for food and feed** (Doctoral dissertation, MSc thesis, Technical University of Denmark, Copenhagen).
- Crevieu-Gabriel, I. (1999). **Digestion des protéines végétales chez les monogastriques. Exemple des protéines de pois.** Productions Animales 2 (12), 147-161.
- Cruz-Suárez, L. E., Tapia Salazar, M., Nieto López, M. G., & Ricque Marie, D. (2008). **A review of the effects of macroalgae in shrimp feeds and in co-culture.** 304-333.

- Cruz-Suárez, L. E., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M. G., Guajardo-Barbosa, C., & Ricque-Marie, D. (2009). **Comparison of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* as ingredients in shrimp feeds.** *Aquaculture Nutrition*, 15(4), 421-430.
- Dahm, R., & Geisler, R. (2006). **Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species.** *Marine biotechnology*, 8(4), 329-345.
- Dawczynski, C., Schubert, R., & Jahreis, G. (2007). **Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products.** *Food chemistry*, 103(3), 891-899.
- de Oliveira, M. N., Freitas, A. L. P., Carvalho, A. F. U., Sampaio, T. M. T., Farias, D. F., Teixeira, D. I. A., ... & Pereira, J. G. (2009). **Nutritive and non-nutritive attributes of washed-up seaweeds from the coast of Ceará, Brazil.** *Food chemistry*, 115(1), 254-259.
- DGRM - Direção Geral dos Recursos Naturais, Segurança e Recursos Marítimos (2015). **Plano Estratégico para a Aquicultura Portuguesa 2014-2020.** Principais eixos de intervenção estratégica, 96p, 2014
- DGRM, **Aquicultura.** Acedido a 13 de setembro de 2019, disponível em https://www.dgrm.mam.gov.pt/xportal/xmain?xpid=dgrm&actualmenu=1470669&selectedmenu=1476137&xpgid=genericPageV2&conteudoDetalhe_v2=168786
- Díaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Borderías, J., & Saura-Calixto, F. (2011). **Technological effect and nutritional value of dietary antioxidant *Fucus* fiber added to fish mince.** *Journal of aquatic food product technology*, 20(3), 295-307.
- El Gamal, A. A. (2010). **Biological importance of marine algae.** *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18(1), 1-25.
- Ergün, S., Soyutürk, M., Güroy, B., Güroy, D., & Merrifield, D. (2009). **Influence of *Ulva* meal on growth, feed utilization, and body composition of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at two levels of dietary lipid.** *Aquaculture International*, 17(4), 355.
- FAO. (2018a). **The global status of seaweed production, trade and utilization.** Globefish Research Programme Volume 124. Rome. 120 pp. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

- FAO. (2018b). **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible**. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Feis, M. E. (2010). **Reproduction of the genus *Fucus*** (Doctoral dissertation, Faculty of Science and Engineering).
- Fleurence, J. (1999). **Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses**. Trends in food science & technology, 10(1), 25-28.
- Fleurence, J., Le Coeur, C., Mabeau, S., Maurice, M., & Landrein, A. (1995). **Comparison of different extractive procedures for proteins from the edible seaweeds *Ulva rigida* and *Ulva rotundata***. Journal of Applied Phycology, 7(6), 577-582.
- Forster, J., & Radulovich, R. (2015). **Seaweed and food security**. In Seaweed Sustainability. Academic Press, 289-313.
- Francis, G., Makkar, H. P., & Becker, K. (2001). **Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish**. Aquaculture, 199(3-4), 197-227.
- Garson, J. (1989). **Marine natural products**. Nat. Prod. Rep. 6, 143–170.
- Gatlin III, D. M., Barrows, F. T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy, R. W., ... & Overturf, K. (2007). **Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review**. Aquaculture research, 38(6), 551-579.
- Geurden, I., Gondouin, E., Rimbach, M., Koppe, W., Kaushik, S., & Boujard, T. (2006). **The evaluation of energy intake adjustments and preferences in juvenile rainbow trout fed increasing amounts of lipid**. Physiology & behavior, 88(4-5), 325-332.
- Graham, J. E., Graham, L.E., Wilcox, L.W. (2008). **Algae, 2nd Edition**. Pearson, 2010. 720pp.
- Hardy, R. W. (2010). **Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal**. Aquaculture Research, 41(5), 770-776.
- Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). **Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation**. Journal of applied phycology, 23(3), 543-597.

- Hong, D. D., Hien, H. M., & Son, P. N. (2007). **Seaweeds from Vietnam used for functional food, medicine and biofertilizer**. *Journal of Applied Phycology*, 19(6), 817-826.
- INE, Instituto Nacional de Estatística. (2019). **Estatísticas da Pesca 2018**. I.P., Lisboa, Portugal. CC BY 4.0.
- Ito, K., & Hori, K. (1989). **Seaweed: chemical composition and potential food uses**. *Food reviews international*, 5(1), 101-144.
- Jaya-Ram, A., Kuah, M. K., Lim, P. S., Kolkovski, S., & Shu-Chien, A. C. (2008). **Influence of dietary HUFA levels on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs expression in female zebrafish *Danio rerio***. *Aquaculture*, 277(3-4), 275-281.
- Kain, J. M., & Destombe, C. (1995). **A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria***. *Journal of applied phycology*, 7(3), 269.
- Karga, J., & Mandal, S. C. (2017). **Effect of different feeds on the growth, survival and reproductive performance of zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822)**. *Aquaculture nutrition*, 23(2), 406-413.
- Karsten, U., West, J. A., Zuccarello, G. C., Nixdorf, O., Barrow, K. D., & King, R. J. (1999). **Low molecular weight carbohydrate patterns in the Bangiophyceae (*Rhodophyta*)**. *Journal of Phycology*, 35(5), 967-976.
- Kaushik, S.J. (1989). **Use of alternative protein sources for intensive rearing of carnivorous fishes**. In: Flos, R., Tort, L., Torres, P. Eds., *Mediterranean Aquaculture*. Ellis Horwood, Chichester, 125–138.
- Kim, K. T. (2012). **Seasonal variation of seaweed components and novel biological function of fucoidan extracted from brown algae in Quebec (Tese de Doutorado)**. Disponível em <https://corpus.ulaval.ca/jspui/handle/20.500.11794/23282>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). **Stages of embryonic development of the zebrafish**. *Developmental dynamics*, 203(3), 253-310.
- Kousoulaki, K., Østbye, T. K. K., Krasnov, A., Torgersen, J. S., Mørkøre, T., & Sweetman, J. (2015). **Metabolism, health and fillet nutritional quality in**

Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing n-3-rich microalgae.

Journal of nutritional science, 4. doi:10.1017/jns.2015. 1-14.

- Kraan, S. (2013). **Mass-cultivation of carbohydrate rich macroalgae, a possible solution for sustainable biofuel production.** Mitig Adapt Strateg Glob Chang 18:27–46
- Krogdahl, Å., Hemre, G. I., & Mommsen, T. P. (2005). **Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages.** Aquaculture nutrition, 11(2), 103-122.
- Kumar, C. S., Ganesan, P., Suresh, P. V., & Bhaskar, N. (2008). **Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds-a review.** Journal of Food Science and Technology, 45(1), 1.
- Lawrence, C., Best, J., James, A., & Maloney, K. (2012). **The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*).** Aquaculture, 368, 103-108.
- Manilal, A., Selvin, J., & George, S. (2012). **In vivo therapeutic potentiality of red seaweed, *Asparagopsis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta) in the treatment of Vibriosis in *Penaeus monodon* Fabricius.** Saudi journal of biological sciences, 19(2), 165-175.
- Marinho-Soriano, E., Morales, C., & Moreira, W. S. C. (2002). **Cultivation of *Gracilaria* (Rhodophyta) in shrimp pond effluents in Brazil.** Aquaculture Research, 33(13), 1081-1086.
- Marinho-Soriano, E., Nunes, S. O., Carneiro, M. A. A., & Pereira, D. C. (2009). **Nutrients' removal from aquaculture wastewater using the macroalgae *Gracilaria birdiae*.** Biomass and Bioenergy, 33(2), 327-331.
- Mata, L., Schuenhoff, A., & Santos, R. (2010). **A direct comparison of the performance of the seaweed biofilters, *Asparagopsis armata* and *Ulva rigida*.** Journal of Applied Phycology, 22(5), 639-644.
- McDermid, K. J., & Stuercke, B. (2003). **Nutritional composition of edible Hawaiian seaweeds.** Journal of Applied Phycology, 15(6), 513-524.
- Miles, R. D., & Chapman, F. A. (2006). **The benefits of fish meal in aquaculture diets.** IFAS Extension, University of Florida.

- Monteiro, M., Santos, R. A., Iglesias, P., Couto, A., Serra, C. R., Gouveias, I., ... & Díaz-Rosales, P. (2019). **Effect of extraction method and solvent system on the phenolic content and antioxidant activity of selected macro-and microalgae extracts.** Journal of Applied Phycology, doi: 10.1007/s10811-019-01927-1. 1-14.
- Mustafa, G., Wakamatsu, S., Takeda, T. A., Umino, T., & Nakagawa, H. (1995). **Effects of algae meal as feed additive on growth, feed efficiency, and body composition in red sea bream.** Fisheries Science, 61(1), 25-28.
- Muzinic, L. A., Thompson, K. R., Metts, L. S., Dasgupta, S., & Webster, C. D. (2006). **Use of turkey meal as partial and total replacement of fish meal in practical diets for sunshine bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) grown in tanks.** Aquaculture Nutrition, 12(1), 71-81.
- Neori, A., Chopin, T., Troell, M., Buschmann, A. H., Kraemer, G. P., Halling, C., ... & Yarish, C. (2004). **Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture.** Aquaculture, 231(1-4), 361-391.
- Neori, A., Chopin, T., Troell, M., Buschmann, A.H., Kraemer, G.P., Halling, G., *et al.* (2004). **Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern aquaculture.** Aquaculture, 231(1-4), 361-391.
- Parichy, D. M., Elizondo, M. R., Mills, M. G., Gordon, T. N., & Engeszer, R. E. (2009). **Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish.** Developmental dynamics, 238(12), 2975-3015.
- Peixoto, M. J., Magnoni, L., Gonçalves, J. F., Twijnstra, R. H., Kijjoa, A., Pereira, R., ... & Ozório, R. O. (2019). **Effects of dietary supplementation of *Gracilaria* sp. extracts on fillet quality, oxidative stress, and immune responses in European seabass (*Dicentrarchus labrax*).** Journal of applied phycology, 31(1), 761-770.
- Peng, C., Hong-BO, S., Di, X., & Song, Q. (2009). **Progress in *Gracilaria* biology and developmental utilization: main issues and prospective.** Reviews in Fisheries Science, 17(4), 494-504.

- Percival, E. (1979). **The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: their basic structure, biosynthesis and function.** British Phycological Journal, 14(2), 103-117.
- Pereira, R., & Yarish, C. (2008). **Mass production of Marine Macroalgae.** In: Sven Erik Jørgensen, S.E., & Fath, B.D. (Eds.). Encyclopedia of Ecology, 2236–2247.
- Pereira, R., Sousa-Pinto, I., & Yarish, C. (2004). **Field and culture studies of the life history of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta) from Portugal.** Phycologia, 43(6), 756-767.
- Pereira, R., Yarish, C., & Sousa-Pinto, I. (2006). **The influence of stocking density, light and temperature on the growth, production and nutrient removal capacity of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta).** Aquaculture, 252(1), 66-78.
- Peres, H., & Oliva-Teles, A. (1999). **Influence of temperature on protein utilization in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*).** Aquaculture, 170(3-4), 337-348.
- Pinchetti, J. L. G., del Campo Fernández, E., Díez, P. M., & Reina, G. G. (1998). **Nitrogen availability influences the biochemical composition and photosynthesis of tank-cultivated *Ulva rigida* (Chlorophyta).** Journal of Applied Phycology, 10(4), 383.
- Potty, V. H. (1996). **Physio-chemical [physico-chemical] aspects, physiological functions, nutritional importance and technological significance of dietary fibres: A critical appraisal.** Journal of Food science and Technology, 33(1), 1-18.
- Prabu, D. L., Sahu, N. P., Pal, A. K., Dasgupta, S., & Narendra, A. (2016). **Immunomodulation and interferon gamma gene expression in sutchi cat fish, *Pangasianodon hypophthalmus*: effect of dietary fucoidan rich seaweed extract (FRSE) on pre and post challenge period.** Aquaculture research, 47(1), 199-218.
- Radulovich, R., Neori, A., Valderrama, D., Reddy, C. R. K., Cronin, H., & Forster, J. (2015). **Farming of seaweeds.** In Seaweed Sustainability. Academic Press, 27-59.
- Read, P., & Fernandes, T. (2003). **Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe.** Aquaculture, 226(1-4), 139-163.

- Reyes-Becerril, M., Angulo, C., Estrada, N., Murillo, Y., & Ascencio-Valle, F. (2014). **Dietary administration of microalgae alone or supplemented with *Lactobacillus sakei* affects immune response and intestinal morphology of Pacific red snapper (*Lutjanus peru*)**. Fish & shellfish immunology, 40(1), 208-216.
- Ribas, L., & Piferrer, F. (2014). **The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research**. Reviews in Aquaculture, 6(4), 209-240.
- Rodrigues, M. S. (2015). **Caracterização da composição nutricional da macroalga *Fucus vesiculosus* e a alteração dos compostos bioativos nos diferentes métodos de secagem** (Doctoral dissertation).
- Rodríguez-González, H., Orduña-Rojas, J., Villalobos-Medina, J. P., García-Ulloa, M., Polanco-Torres, A., López-Álvarez, E. S., ... & Hernández-Llamas, A. (2014). **Partial inclusion of *Ulva lactuca* and *Gracilaria parvispora* meal in balanced diets for white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)**. Journal of applied phycology, 26(6), 2453-2459.
- Satoh, K., Nakagawa, H., & Kasahara, S. (1987). **Effect of *Ulva* meal supplementation on disease resistance of red sea bream**. Nippon Suisan Gakkaishi, 53, 1115-1120.
- Schuenhoff, A., Shpigel, M., Lupatsch, I., Ashkenazi, A., Msuya, F. E., & Neori, A. (2003). **A semi-recirculating, integrated system for the culture of fish and seaweed**. Aquaculture, 221(1-4), 167-181.
- Shiau, S. Y. (1997). **Utilization of carbohydrates in warmwater fish - with particular reference to tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus***. Aquaculture, 151(1-4), 79-96.
- Shpigel, M., & Neori, A. (1996). **The integrated culture of seaweed, abalone, fish and clams in modular intensive land-based systems: I. Proportions of size and projected revenues**. Aquacultural Engineering, 15(5), 313-326.
- Shpigel, M., Guttman, L., Shauli, L., Odintsov, V., Ben-Ezra, D., & Harpaz, S. (2017). ***Ulva lactuca* from an integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) biofilter system as a protein supplement in gilthead seabream (*Sparus aurata*) diet**. Aquaculture, 481, 112-118.

- Silva, D. M., Valente, L. M. P., Sousa-Pinto, I., Pereira, R., Pires, M. A., Seixas, F., & Rema, P. (2015). **Evaluation of IMTA-produced seaweeds (*Gracilaria*, *Porphyra*, and *Ulva*) as dietary ingredients in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., juveniles. Effects on growth performance and gut histology.** Journal of applied phycology, 27(4), 1671-1680.
- Singh, S. P., & Singh, P. (2015). **Effect of temperature and light on the growth of algae species: a review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, 50, 431-444.
- Tacon, A. G., & Metian, M. (2015). **Feed matters: satisfying the feed demand of aquaculture.** Reviews in Fisheries Science & Aquaculture, 23(1), 1-10.
- Titlyanov, E. A., & Titlyanova, T. V. (2010). **Seaweed cultivation: methods and problems.** Russian Journal of Marine Biology, 36(4), 227-242.
- Ulloa, P. E., Iturra, P., Neira, R., & Araneda, C. (2011). **Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes.** Reviews in Fish Biology and Fisheries, 21(4), 649-666.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. (2017). **World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables.** Working Paper No. ESA/P/WP/248.
- Valente, L. M. P., Gouveia, A., Rema, P., Matos, J., Gomes, E. F., & Pinto, I. S. (2006). **Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles.** Aquaculture, 252(1), 85-91.
- Van Doan, H., Doolgindachbaporn, S., & Suksri, A. (2014). **Effects of low molecular weight agar and *Lactobacillus plantarum* on growth performance, immunity, and disease resistance of basa fish (*Pangasius bocourti*, Sauvage 1880).** Fish & shellfish immunology, 41(2), 340-345.
- Wassef, E. A., El-Sayed, A. F. M., Kandeel, K. M., & Sakr, E. M. (2005). **Evaluation of *Pterocladia* (Rhodophyta) and *Ulva* (Chlorophyta) meals as additives to gilthead seabream *Sparus aurata* diets.** Egyptian Journal of Aquatic Research, 31, 321-332.

- Wong, K. H., & Cheung, P. C. (2000). **Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds: Part I—proximate composition, amino acid profiles and some physico-chemical properties.** Food chemistry, 71(4), 475-482.
- Yamamoto, T., Shima, T., Unuma, T., Shiraishi, M., Akiyama, T., & Tabata, M. (2000). **Voluntary intake of diets with varying digestible energy contents and energy sources, by juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, using self-feeders.** Fisheries science, 66(3), 528-534.
- Yousefi, S., Hoseinifar, S. H., Paknejad, H., & Hajim oradloo, A. (2018). **The effects of dietary supplement of galactooligosaccharide on innate immunity, immune related genes expression and growth performance in zebrafish (*Danio rerio*).** Fish & shellfish immunology, 73, 192-196.
- Zhang, Q., Li, N., Zhou, G., Lu, X., Xu, Z., & Li, Z. (2003). **In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanesis* (Rhodophyta) in aging mice.** Pharmacological Research, 48(2), 151-155.